

Biochemische und funktionelle Charakterisierung der
zell-assoziierten Phospholipase A, PlaB,
von *Legionella pneumophila*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

Von

Dipl.-Biol. Jennifer Bender
4.8.1979, Nürnberg

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Erwin Schneider, Humboldt-Universität zu Berlin
2. PD Dr. Antje Flieger, Robert Koch-Institut, Wernigerode
3. PD Dr. Klaus Heuner, Robert Koch-Institut, Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 12. 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1.12.2005 bis zum 30.09.2009 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Erwin Schneider am Institut für Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin und im Labor von Frau PD Dr. Antje Flieger am Robert Koch-Institut durchgeführt.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

(Jennifer Bender)

Berlin, den

Danksagung

Etliche Personen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auf diesem Wege möchte ich mich bei allen Beteiligten herzlich bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau PD Dr. Antje Flieger, zum einen für die Möglichkeit, dieses interessante Thema im Rahmen eines DFG-Projektes bearbeiten zu können, zum anderen für die konstruktiven Diskussionen, fachlichen Anregungen und Hilfestellungen sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Erwin Schneider möchte ich sehr herzlich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Humboldt-Universität danken.

Herrn PD Dr. Klaus Heuner gebührt in gleicher Weise mein herzlicher Dank für Diskussionen von *Legionella*-spezifischen Fragestellungen im Falle PlaB.

Im Besonderen möchte ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der NG5 bzw. des FG11-Legionellen bedanken. Mit den Kollegen Dr. Philipp Auraß, Ferda Ersöz, Dr. Stefanie Klar, Dr. Elena Rastew, Kerstin Rydzewski und Enrico Siegbrecht verbrachte ich eine unvergessene Zeit in Berlin. Den Wernigerödern Simone Dumschat, Katrin Jaschinski, Ingolf Karl, Susanne Karste, Dr. Christina Lang, Maren Schlegel und Kathleen Seipel danke ich für eine grandiose Zeit an der neuen Wirkungsstätte am Fuße des Brocken.

Meiner PlaB-Schwester Eva Schunder danke ich für die tolle Zusammenarbeit. Nach überstandenen Tierversuch sind wir unserem „Früchtchen“ weiter auf der Spur geblieben und haben das Motto „Alles wird gut!“ nie aus den Augen verloren.

Maren Stämmmler möchte ich herzlich für die FT-IR Analysen danken sowie Dr. Janina Lorenz für erste Versuche bezüglich der PlaB-abhängigen Chemokinsekretion.

Vielen herzlichen Dank auch an alle hilfsbereiten RKI-Mitarbeiter der Service-Einheiten.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich meinen Eltern, Frau Dr. Doris Bender und Herrn Dr. Richard Bender, aussprechen. Beide haben mich mein Leben lang in jeglicher Weise unterstützt und somit auch zu meiner beruflichen Ausbildung beigetragen.

Zu guter Letzt danke ich meinem Freund Tobias Größl von ganzem Herzen dafür, dass er mir trotz der wiederholten, beruflich bedingten räumlichen Trennungen seit vielen Jahren unterstützend zur Seite steht.

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
BCYE	<i>Buffered Charcoal Yeast Extract</i>
BMGY/BMMY	<i>Buffered Glycerol or Methanol-complex Medium</i>
BYE	<i>Buffered Yeast Extract</i>
bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
ca.	<i>circa</i>
CFU	<i>colony forming units</i> (Koloniebildende Einheiten)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
1,2-DG	1,2-Dipalmitoylglycerol
DMPE	Dipalmitoyldimethylphosphatidylethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPE	Dipalmitoylphosphatidylethanolamin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
DPPS	Dipalmitoylphosphatidylserin
dNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	<i>et alias</i> , und andere
FKS	fötales Kälberserum
FFA	freie Fettsäuren
FT-IR Spektroskopie	Fourier Transformations- Infrarot Spektroskopie
g	Gramm
GCAT	Glyzerophospholipid-Cholesterol Azytransferase
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	bidestilliertes Wasser
IL-8	Interleukin-8
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	kilo-Dalton
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
LB	Luria-Bertani
LPLA	Lysophospholipase A
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)

M	Molar
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisation
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktorprotein-1
MD	<i>Minimal Dextrose</i>
Min	Minute
MLLPC	1-Monolauroyllysophosphatidylcholin
MMPE	Dipalmitoylmonomethylphosphatidylethanolamin
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MOLPC	1-Monooctanoyllysophosphatidylcholin
1-MPG	1-Monopalmitoylglycerol
MPLPA	1-Monopalmitoyllysophosphatidsäure
MPLPC	1-Monopalmitoyllysophosphatidylcholin
MPLPE	1-Monopalmitoyllysophosphatidylethanolamin
MPLPG	1-Monopalmitoyllysophosphatidylglycerol
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Mw	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
OD_{Wellenlänge(in nm)}	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PAGE	<i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i>
pmol	Pikomol
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pI	Isoelektrischer Punkt
PLA	Phospholipase A
PLB	Phospholipase B
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PYG	<i>Peptone Yeast Extract Glucose</i>
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodezyl Sulfat
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	Derivat von <i>Super Optimal Broth</i>
s.	Siehe
sek	Sekunde
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TIMP-2	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases - 2</i>
TPG	Tripalmitin

U	Units (Enzymaktivität)
UV	Ultra Violett
V	Volt
WT	Wildtyp
× g	ein Vielfaches der Erdbeschleunigung (g)
YPD	<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Selbstständigkeitserklärung	III
Danksagung	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Zusammenfassung	- 1 -
2 Einleitung	- 3 -
2.1. Die Rolle von <i>Legionella pneumophila</i> als Krankheitserreger	- 3 -
2.1.1. Entdeckung von <i>L. pneumophila</i>	- 3 -
2.1.2. Mikrobiologie und Ökologie	- 3 -
2.1.3. Legionellose – Pathogenese, Diagnostik und Therapie	- 5 -
2.1.4. Epidemiologie und Prävention	- 6 -
2.2. Lebenszyklus und Virulenzfaktoren von <i>Legionella</i> Bakterien	- 7 -
2.3. Phospholipasen und Pathogenität	- 9 -
2.3.1. Eigenschaften und Klassifizierung von Phospholipasen	- 9 -
2.3.2. Faltung und Wirkmechanismus von Phospholipasen	- 13 -
2.3.3. Phospholipasen als bakterielle Virulenzfaktoren	- 14 -
2.3.3.1. Phospholipasen als Virulenzfaktoren von extrazellulären Bakterien	- 16 -
2.3.3.2. Phospholipasen als Virulenzfaktoren von intrazellulären Bakterien	- 20 -
2.4. Immunabwehr einer Legionelleninfektion	- 25 -
2.5. Ziel der Arbeit	- 27 -
3 Material und Methoden	- 28 -
3.1. Material	- 28 -
3.1.1. Laborausstattung	- 28 -
3.1.2. Spezielle Materialien	- 28 -
3.1.3. Chemikalien	- 29 -
3.1.4. Lipidsubstrate	- 31 -
3.1.5. Puffer und Lösungen	- 31 -
3.1.6. Enzyme, Standards, Antikörper	- 32 -
3.1.7. Analyse-Kits	- 33 -
3.1.8. Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen	- 33 -
3.1.8.1. Verwendete Plasmide	- 33 -
3.1.8.2. Verwendete Oligonukleotide und Sonden	- 35 -
3.1.8.3. Verwendete Bakterien, Zellen und Versuchstiere	- 36 -
3.1.9. Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)....	- 36 -
3.1.10. Kulturmedien für Bakterien und Zellen	- 38 -
3.1.11. Verwendete Software	- 40 -
3.2. Methoden	- 40 -
3.2.1. Anzucht von Bakterien und Hefen	- 40 -
3.2.1.1. <i>Legionella pneumophila</i>	- 40 -
3.2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	- 41 -
3.2.1.3. <i>Pichia pastoris</i>	- 41 -
3.2.1.4. Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen	- 41 -
3.2.2. Anzucht von A549 Lungenepithelzell-, U937 Makrophagen- und <i>Acanthamoeba</i> - Zellkulturen	- 42 -

3.2.3.	Isolierung von Nukleinsäuren.....	- 42 -
3.2.3.1.	Isolierung von chromosomaler DNA aus Lungengewebe.....	- 42 -
3.2.3.2.	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>P. pastoris</i>	- 42 -
3.2.3.3.	Isolierung von extrachromosomaler DNA	- 43 -
3.2.3.4.	RNA-Isolierung	- 43 -
3.2.4.	Fällung von Nukleinsäuren mittels EtOH	- 43 -
3.2.5.	Nukleinsäure-Gelelektrophorese	- 44 -
3.2.6.	Modifikation von Nukleinsäuren.....	- 44 -
3.2.6.1.	Verdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung	- 44 -
3.2.6.2.	Ligation von DNA Fragmenten.....	- 44 -
3.2.6.3.	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	- 45 -
3.2.6.4.	Einfügen von Punktmutationen mittels „ <i>Combined Chain Reaction</i> “ (CCR)	- 46 -
3.2.6.5.	Real-time Polymerase Kettenreaktion	- 47 -
3.2.6.6.	Reverse Transkriptase –Polymerase Kettenreaktion	- 47 -
3.2.6.7.	Sequenzierung-Polymerase Kettenreaktion.....	- 48 -
3.2.7.	Herstellung und Transformation von elektrokompenten Zellen.....	- 49 -
3.2.7.1.	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	- 49 -
3.2.7.2.	Herstellung elektrokompenter <i>L. pneumophila</i>	- 50 -
3.2.7.3.	Herstellung elektrokompenter <i>P. pastoris</i>	- 50 -
3.2.7.4.	Transformation von DNA.....	- 50 -
3.2.8.	Transfektion von A549 Zellen.....	- 52 -
3.2.9.	Test auf bakterizide Eigenschaften von PlaB	- 53 -
3.2.10.	Proteinanalytik.....	- 53 -
3.2.10.1.	Fällung von Proteinen mittels TCA-EtOH	- 53 -
3.2.10.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	- 54 -
3.2.10.3.	Eindimensionale (1D) - SDS-PAGE	- 54 -
3.2.10.4.	Western Blot und Immundetektion.....	- 54 -
3.2.11.	Expression und Reinigung von Proteinen	- 55 -
3.2.11.1.	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	- 55 -
3.2.11.2.	Proteinexpression in <i>P. pastoris</i>	- 56 -
3.2.11.3.	<i>In vitro</i> Translation	- 56 -
3.2.11.4.	Reinigung mittels Ionentausch- und Affinitätschromatographie.....	- 57 -
3.2.11.5.	Reinigung und Solubilisierung von „ <i>inclusion bodies</i> “	- 58 -
3.2.11.6.	Rückfaltung von PlaB.....	- 58 -
3.2.12.	Nachweis von Phospholipaseaktivität	- 59 -
3.2.12.1.	Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen	- 59 -
3.2.12.2.	Gewinnung von U937 Zelllysaten und Überständen.....	- 60 -
3.2.12.3.	Verdau von Lipidsubstraten	- 60 -
3.2.12.4.	Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren.....	- 61 -
3.2.12.5.	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie	- 61 -
3.2.12.6.	Hämolyseassay	- 62 -
3.2.13.	Extraktion von Lipopolysaccharid (LPS).....	- 62 -
3.2.14.	Koinfektion von <i>A. castellanii</i> Amöben, A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen mit <i>L. pneumophila</i> Corby.....	- 63 -
3.2.14.1.	Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in <i>A. castellanii</i>	- 63 -
3.2.14.2.	Infektion von U937 Makrophagenzellen.....	- 63 -
3.2.14.3.	Infektion von A549 Lungenepithelzellen zur Bestimmung der Zytokinsekretion.....	- 64 -
3.2.15.	Infektion von Meerschweinchenlungen.....	- 65 -
3.2.16.	Bestimmung der Zytokinsekretion von infizierten A549 Zellen.....	- 65 -

3.2.16.1.	Screening auf Zytokinsekretion mittels des „Human Inflammation Antibody Array 3“	- 65 -
3.2.16.2.	Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA	- 66 -
3.2.17.	Immunfluoreszenzmikroskopie	- 67 -
3.2.18.	FT-IR Spektroskopie	- 67 -
4	Ergebnisse.....	- 69 -
4.1.	Biochemische Analyse von <i>L. pneumophila</i> PlaB.....	- 69 -
4.1.1.	Biochemische Eigenschaften von PlaB	- 69 -
4.1.1.1.	Das PlaB-Protein	- 69 -
4.1.1.2.	Konstruktion des Komplementationsvektors pJB04	- 70 -
4.1.1.3.	Lipidhydrolyse-Profil von PlaB	- 70 -
4.1.1.4.	Selektivität gegenüber Variationen in der Fettsäurekettenlänge	- 71 -
4.1.2.	Sequenzhomologie von PlaB und PlaB-ähnlichen Proteinen.....	- 72 -
4.1.3.	Bestimmung der katalytisch relevanten Aminosäuren von PlaB	- 72 -
4.1.3.1.	„Site-directed mutagenesis“ von PlaB.....	- 73 -
4.1.3.2.	Lipolytische Aktivität von PlaB-Mutanten	- 74 -
4.1.3.3.	Hämolytische Aktivität von PlaB-Mutanten	- 79 -
4.1.4.	Relevanz des C-Terminus.....	- 80 -
4.1.5.	Expression und Reinigung von PlaB	- 81 -
4.1.5.1.	Expression in <i>L. pneumophila</i>	- 81 -
4.1.5.2.	Expression in <i>E.coli</i>	- 82 -
4.1.5.3.	Expression in <i>P. pastoris</i>	- 87 -
4.1.5.4.	<i>In vitro</i> Translation und Transfektion.....	- 88 -
4.2.	Verbreitung von PlaB	- 91 -
4.2.1.	Lipolytische Aktivität klinischer Isolate von <i>L. pneumophila</i>	- 91 -
4.2.2.	Vorkommen von PlaB-Enzymen in nicht- <i>pneumophila</i> Legionellenstämmen.....	- 92 -
4.2.2.1.	<i>plaB</i> -Gene im Genom von <i>L. gormanii</i> und <i>L. spiritensis</i>	- 93 -
4.2.2.2.	Lipolytische und hämolytische Aktivität von <i>L. spiritensis</i> PlaB	- 94 -
4.3.	Funktionelle Analyse von PlaB	- 95 -
4.3.1.	Beeinflussung der Viabilität von <i>L. pneumophila</i> durch PlaB-Aktivität.....	- 95 -
4.3.2.	Untersuchungen zur LPS-Zusammensetzung.....	- 101 -
4.3.3.	PlaB als Bakteriozin	- 102 -
4.3.4.	Untersuchung der intrazellulären Vermehrung und lipolytischer Aktivität von <i>L. pneumophila plaB</i> Mutanten in Zellkultur.....	- 103 -
4.3.5.	Untersuchung zur intrazellulären Vermehrung der <i>L. pneumophila plaB</i> Mutante nach Meerschweincheninfektion.....	- 105 -
4.3.5.1.	Bestimmung der Bakterienlast in Meerschweinchenlungen und Milz.....	- 106 -
4.3.5.2.	Untersuchungen zur veränderten Lipidzusammensetzung der Lungenproben nach Legionelleninfektion.....	- 107 -
4.3.6.	Beeinflussung der Zytokinexpression durch PlaB.....	- 109 -
4.3.6.1.	„Screening“ auf veränderte Zytokinexpression nach Infektion von A549 Lungenepithelzellen.....	- 110 -
4.3.6.2.	Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)“	- 111 -
4.3.6.3.	Untersuchung zum Einfluss von PlaB auf die Flagellenexpression	- 113 -
5	Diskussion	- 115 -
5.1.	Identifizierung wichtiger Aminosäuren und Proteindomänen für die lipolytische Aktivität von PlaB	- 115 -

5.1.1.	PlaB und Homologe, eine neue Familie von Phospholipasen	- 115 -
5.1.2.	Hydrolyse von Phosphatidylcholin als wichtiger Bestandteil der Virulenz	- 118 -
5.2.	Die Bedeutung von PlaB für <i>Legionella pneumophila</i>	- 119 -
5.2.1.	PlaB als Werkzeug für verbesserte Umgebungs- und/oder Wirtsadaptation	- 120 -
5.2.2.	Veränderung der zellulären Immunantwort als Mechanismus für gesteigerte Virulenz	- 122 -
5.2.3.	PlaB als Bakteriozin?	- 126 -
6	Ausblick	- 129 -
7	Literaturverzeichnis	- 130 -
8	Anhang	- 149 -

1 Zusammenfassung

L. pneumophila, der Erreger der Legionärskrankheit, kodiert für eine Vielzahl lipolytischer Enzyme. Bis zu 17 verschiedenen Proteinen kann aufgrund von Sequenzhomologien oder experimenteller Analyse phospholipolytische Eigenschaft zugeschrieben werden. Neben sekretierten Formen wird eine besonders aktive zell-assoziierte Variante exprimiert, die Phospholipase A/Lysophospholipase A PlaB. Wie bereits gezeigt werden konnte, kodiert das *plaB* Gen für die hauptsächliche membranständige Phospholipase A von *L. pneumophila* mit Enzymaktivitäten, die die Aktivität sekretierter Proteine um das 100-fache übersteigen.

Da PlaB zu keiner der bisher beschriebenen Phospholipasen Homologien aufweist, wurden in dieser Arbeit durch gezielte Mutagenese die katalytisch wichtigen Aminosäuren identifiziert. Dies ergab, dass PlaB zwar eine für Lipasen und Proteasen typische katalytische Triade aus Serin, Asparat und Histidin ausbildet, die umliegenden Motive sich aber deutlich von bisher beschriebenen Enzymklassen unterscheiden. Somit stellt PlaB das erste näher charakterisierte Mitglied einer neuen Familie phospholipolytischer Enzyme dar. Im Weiteren konnten für die Substratspezifität wichtige Aminosäurereste identifiziert werden. Dabei stellte sich heraus, dass die Fähigkeit zur Hydrolyse von cholkettenträgenden Substraten besonders suszeptibel gegenüber Mutationen war. Da im Vergleich zu nicht-*pneumophila* Stämmen, wie z. B. *L. spiritensis*, nur *L. pneumophila* in der Lage war, diese Lipide in hohem Maße umzusetzen, kann die Eigenschaft von PlaB, Phosphatidylcholin (PC) zu hydrolysieren, einen Virulenzvorteil für *L. pneumophila* bedeuten. Die Hypothese konnte durch Hämolyseexperimente bestärkt werden. Hier zeigten sich Mutanten mit reduziertem Potential zur Hydrolyse von PC weniger zytotoxisch gegenüber humanen Erythrozyten.

Das zell-zerstörende Potential von PlaB könnte somit eine enorme Auswirkung auf die Virulenzeigenschaften von *L. pneumophila* haben. Wie in der vorliegenden Arbeit untersucht, bestätigten *in vitro* Experimente, dass PlaB die hauptsächliche Aktivität während einer Makrophageninfektion darstellt, die Deletion des Gens aber keine Auswirkungen auf das Replikationspotential der Bakterien hat. Ganz im Gegenteil dazu waren *plaB* Insertionsmutanten bei der Infektion von Meerschweinchen in ihrer Vermehrungsfähigkeit in der Lunge als auch in der Verbreitung der Erreger zur Milz der Tiere reduziert. Um den Grund des Defektes näher zu erörtern, wurde in einem *Screen* auf 40 verschiedene Entzündungsmediatoren die Sekretion von IL-8, MCP-1, RANTES und TIMP-2 als PlaB-abhängig identifiziert.

ZUSAMMENFASSUNG

Somit repräsentiert die zell-assoziierte Phospholipase A, PlaB, von *L. pneumophila* eine neue Klasse lipolytischer Enzyme und kann durch Hydrolyse eines breiten Substratspektrums, insbesondere durch Hydrolyse von PC, die Vermehrung und Verbreitung des Erregers im Wirtorganismus unterstützen.

2 Einleitung

2.1. Die Rolle von *Legionella pneumophila* als Krankheitserreger

2.1.1. Entdeckung von *L. pneumophila*

Im Jahre 1976 kam es in Philadelphia (USA) beim Veteranentreffen der *American Legion* zu einem, durch einen bis dato unbekannten Erreger verursachten, folgenschweren Ausbruch einer Pneumonie. Es wurden insgesamt 221 Personen infiziert, von denen 34 an der Erkrankung verstarben (74). Nur 6 Monate nach der vermeintlich ersten Epidemie präsentierten McDade und Shepard ein Bakterium als ätiologisches Agens, das nach den Erkrankten und der Lokalisation in der Lunge als *Legionella pneumophila* benannt wurde (178). Im Nachhinein konnten etliche Fälle dieser Lungenentzündung, der Legionärskrankheit, unbekannten Ursprungs mit Legionellen in Verbindung gebracht werden. Der bisher älteste beschriebene Fall geht auf das Jahr 1943 und auf die Spezies *L. micdadei* (früher als Tatlock-Stamm bezeichnet) zurück, wohingegen der erste *L. pneumophila* Stamm zwar 1947 isoliert, aber erst 1979 bestimmt werden konnte (126,177). Neben schwerwiegenden Pneumonien ist dem Erreger eine zweite, mildere Verlaufsform einer Infektion zuzuweisen, das sogenannte Pontiac Fieber. Die selbstlimitierende, Grippe ähnliche Krankheit, ohne Anzeichen einer Lungeninfektion, wurde nach dem Ausbruch einer fieberhaften Erkrankung von 144 Personen in Pontiac (Michigan) im Jahre 1968 benannt (111). Ob es sich beim Erreger des Pontiac Fiebers allerdings um „lebendige“ Legionellen und nicht um die Inhalation toter Mikroorganismen, assoziierter Endotoxine und einer nur geringen Dosis an *Legionella* Bakterien handelt, ist nach wie vor umstritten (79).

2.1.2. Mikrobiologie und Ökologie

Wie von McDade, aber auch von Benson beschrieben, handelt es sich bei Legionellen um Gram negative, stäbchenförmige und obligat aerobe Bakterien, die polar oder lateral begeißelt sind (25,178). Gegenwärtig sind über 50 verschiedene Spezies des Genus *Legionella* beschrieben, von denen alleine *L. pneumophila* in mindestens 15 Serogruppen unterteilt werden kann (25,74,86). Von diesen sind die Serogruppen 1, 4 und 6 am häufigsten mit einer Legionelleninfektion assoziiert. Neben *L. pneumophila*, verantwortlich für ca. 90% der Infektionen, wurden bislang 19 weitere Spezies als humanpathogen eingestuft (187). Eine repräsentative, nationalweite Studie von 508 bestätigten Kulturen ambulant erworbener („community-acquired pneumonia“, CAP) Legionärskrankheit belegte, dass 91,5% der Fälle

EINLEITUNG

dem Erreger *L. pneumophila*, 3,9% *L. longbeachae*, 2,4% *L. bozemanii* und weitere *L. micdadei*, *L. feeleii*, *L. dumoffi*, *L. wadsworthii* und *L. anisa* zugeordnet werden konnten (308).

Wasser stellt das hauptsächliche Reservoir für Legionellen dar. Dabei spielen neben Süßwasserquellen, wie z. B. Seen, vor allem von Menschenhand erschaffene Wasserreservoirs, so z. B. Wasserleitungen, Klimaanlage, Kühltürme, Whirlpools und sogar Gemüsebefeuchtungsanlagen, eine Rolle (24,95,172,186,260). Interessanterweise konnte die Spezies *L. longbeachae* und kürzlich auch *L. pneumophila* der Serogruppe 1 aus Blumenerde isoliert werden (228,289). Weiterhin wurden atmungsunterstützende Apparaturen mit nosokomial erworbenen Legionellenpneumonien in Verbindung gebracht (304). Letztendlich stellen alle kontaminierten Wasserquellen, die Aerosole erzeugen können, potentielle Ausbruchsquellen dar, da diese neben einigen Fällen an Aspiration den Übertragungsweg der Bakterien repräsentieren (263).

Legionellen stellen hohe Anforderungen an ihr Nährmedium und benötigen Aminosäuren als primäre Energiequelle. Des Weiteren zeigen sie sich anfällig gegenüber freien Sauerstoffradikalen, weswegen bei der Anzucht Aktivkohle dem Medium zugesetzt wird (132). Daraus ist ein Kulturmedium hervorgegangen, bestehend aus Hefeextrakt-Aktivkohleagar, L-Cysteinhydrochlorid, Eisenpyrophosphat, ACES-Puffer und α -Ketoglutarat mit einem finalen pH Wert zwischen 6,85 und 6,95 (78,84,204). Diese Ansprüche an komplexe Nährstoffe sind in den vielfältigen Reservoirs, in denen Legionellen vorzufinden sind, nur sehr selten allgegenwärtig. Tatsächlich wurde belegt, dass sich die Bakterien vor allem im nährstoffreichen intrazellulären Raum in freilebenden Protozoen vermehren. Bisher wurden mindestens 15 verschiedene Spezies an Amöben, zwei begeißelte Protozoen und ein Schleimpilz (eine Amöbenunterart, hier *Dictyostelium*) als Replikationsort nachgewiesen (85,116,225,249). Weiterhin sind Spezies beschrieben, die sich ausschließlich in Amöben kultivieren lassen und demnach zuerst als „*Legionella-like amoebal pathogens*“ (LLAPs) bezeichnet, später aber immer wieder dem Genus *Legionella* zugeordnet werden konnten (2). Eine zusätzliche Quelle komplexer Nährstoffangebote und somit ein möglicher Vermehrungsort der Bakterien außerhalb von Wirtszellen stellt der Biofilm dar. Legionellen konnten bereits in solchen Mikroorganismen-Konglomeraten nachgewiesen werden (221). Eine Studie von Murga und Mitarbeitern belegte die Persistenz der Legionellen in Abwesenheit von Wirtszellen, eine Vermehrung fand aber nur nach Zugabe von *Hartmanella vermiformis* statt (190). Somit ist bis heute umstritten, ob sich die Bakterien auch außerhalb ihres Wirtes unter Umweltbedingungen vermehren können.

Neben dem Vorhandensein von Protozoen ist die Umgebungstemperatur für eine erfolgreiche Vermehrung der Legionellen ausschlaggebend. Trotz des relativ breiten Spektrums zwischen 25 und 42°C replizieren sie bei einer Optimaltemperatur von ca. 35°C (145). Dies unterstützt die These, dass die meisten Legionellosefälle auf durch Menschen hergestellte Wasserquellen zurückzuführen sind. Bei diesen ist die durchschnittliche Temperatur höher als unter natürlichen Bedingungen. Zudem ist bewiesen, dass sich die Bakterien bei höheren Temperaturen besser intrazellulär replizieren können (255). Dadurch kommt es zu einem Anstieg und zur Freisetzung der Bakterien, welches die Infektionslast der jeweiligen putativen Quellen deutlich erhöht.

2.1.3. Legionellose – Pathogenese, Diagnostik und Therapie

Manifestationen einer Legionärskrankheit können sowohl ambulanten oder nosokomialen, aber auch Reise assoziierten Ursprungs sein (166). Sporadische oder auch epidemische Infektionen treten hierbei vor allem in den Sommer- und Herbstmonaten auf, da hier das Wachstum der Erreger durch warme Temperaturen gefördert wird (s. 2.1.2).

Durch Inhalation kontaminierter Aerosole gelangen die Erreger in die Lunge und replizieren in Makrophagen und Zellen des Epithelsystems (267). Wie schwerwiegend eine solche Infektion verläuft, hängt neben der Quantität an eingeatmeten Erregern auch von dem Immunstatus des Patienten ab. Ältere Menschen, Suppression der respiratorischen Leistung und des Immunsystems, starkes Rauchen, aber auch das männliche Geschlecht stellen Risikofaktoren für eine Legionelleninfektion dar (40,174). Zudem wurde festgestellt, dass amöbenpassagierte Legionellen ein höheres Virulenzpotential besitzen als in Medium angezogene Bakterien und die Ko-Inokulationen beider Organismen (Legionellen + Amöben) schwerwiegendere Erkrankungen nach sich ziehen (35,59).

Anhand klinischer Symptome ist es nicht möglich, eine Legionellenpneumonie von einer durch Pneumococccen ausgelösten Lungenentzündung zu unterscheiden. Unspezifische Symptome, wie z. B. Fieber, Übelkeit, Appetitlosigkeit und Kopfschmerzen oder auch Durchfall und mentale Verwirrtheit, sind häufig bei der Legionärskrankheit feststellbar (40,263). Hyponatriämie (ein zu niedriger Natriumspiegel im Blut) und alveoläre Infiltrate werden jedoch wesentlich häufiger als bei anderen Pneumonien diagnostiziert (170,263). Der Nachweis einer Legionelleninfektion geschieht vor allem durch Kultivierung der Bakterien. Zwar sind nicht alle Spezies auf diese Weise detektierbar, doch erlaubt die Methode, bei Zugabe spezieller Farbstoffe, die parallele Diagnose verschiedenster Legionellen (188). Neben serologischer Testung, Gen-spezifischen PCRs und direkter Fluoreszenz-Antikörper

Färbung hat sich der Urin-Antigen-Test als Detektionsmethode herauskristallisiert (207). Dieser reagiert zwar fast ausschließlich mit *L. pneumophila* der Serogruppe 1, doch da diese für bis zu 90% der Legionellosen verantwortlich ist, gilt er heute als zuverlässige diagnostische Methode (86,128).

Die Legionärskrankheit ist durch Antibiotikagabe heilbar, jedoch steigt die Mortalitätsrate durch verspätet angesetzte Therapie signifikant an (125). Es wird daher empfohlen, in schwerwiegenden Pneumoniefällen ein gegen Legionellen gerichtetes Antibiotikum, auch ohne Legionellendiagnostik, in die Behandlung mit einzuschließen. Diese könnte Makrolide, Quinolone, Rifampicin oder auch Tetrazykline beinhalten (263). Bis zum heutigen Datum ist noch kein multi-resistenter Legionellenstamm aufgetreten.

2.1.4. Epidemiologie und Prävention

Das Robert Koch-Institut berichtete in seinem infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008 von insgesamt 522 Fällen einer Legionelleninfektion in Deutschland (1). Das entspricht einer bundesweiten Inzidenz von 0,6 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner (Vorjahr: 0,7). Von insgesamt 81,1% der gemeldeten Fälle konnten 95,5% *L. pneumophila*, die restlichen 4,5% anderen *Legionella* Spezies zugeordnet werden. Nur ca. die Hälfte der Infektionen mit *L. pneumophila* wurde subtypisiert und konnte zu insgesamt 82,7% als Vertreter der Serogruppe 1 definiert werden.

Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Zahl der tatsächlichen Legionelleninfektionen die der gemeldeten deutlich übersteigt. Nach Angaben des Kompetenznetzwerks für ambulant erworbene Pneumonien („CAPNETZ“) wurde bei ca. 4% der insgesamt 2503 teilnehmenden Patienten eine Legionellenpneumonie festgestellt (294). Dies würde, Hochrechnungen zur Folge, zwischen 15.000 und 30.000 Fälle sporadischer Lungenentzündungen bedeuten, die auf Legionellen zurückzuführen sind.

Eine Schutzimpfung wird bis dato nicht angeboten. Um den Bakterientiter nach Trinkwasserverordnung in öffentlichen Gebäuden (<100 CFU/100ml) so gering wie möglich zu halten, wurden folgende Präventionsmaßnahmen entwickelt: Erhitzen des Wassers (70-80°C), Kupfer-Silber-Ionisationsbehandlung und Hyperchlorierung, wobei von letzterem wegen der an Wasserleitungen entstehenden Korrosionsschäden vermehrt Abstand genommen wird (187,263).

2.2. Lebenszyklus und Virulenzfaktoren von *Legionella* Bakterien

Rowbotham bemerkte erstmalig im Jahre 1986, dass sich der intrazelluläre Lebenszyklus von *Legionella* in zwei unterschiedliche Phasen gliedert (226). Dies trifft auch auf extrazelluläre, in Medium kultivierte Bakterien zu (52). Durch eine Verknappung des Nährstoffangebotes an Aminosäuren akkumulieren die Zellen das Alarmon ppGpp und treten von dem als „replikative Phase“ bezeichneten Zustand in die sogenannte „transmissive Phase“ über (117). Zellen dieser Phase zeichnen sich phänotypisch durch Natriumsensitivität, Zytotoxizität, osmotische Resistenz und der Fähigkeit, Phago-Lysosomfusionen zu entgehen, aus (267).

Bei Kontakt mit einer Wirtszelle kommt es zur Aufnahme der Legionellen. Diese erfolgt größtenteils nach dem Mechanismus der „coiling“ Phagozytose, bei dem Pseudopodien die Bakterienzelle wie eine Spindel umschließen (s. Abb. 2.1, (137)), sie kann aber auch auf konventionelle Weise geschehen (214).

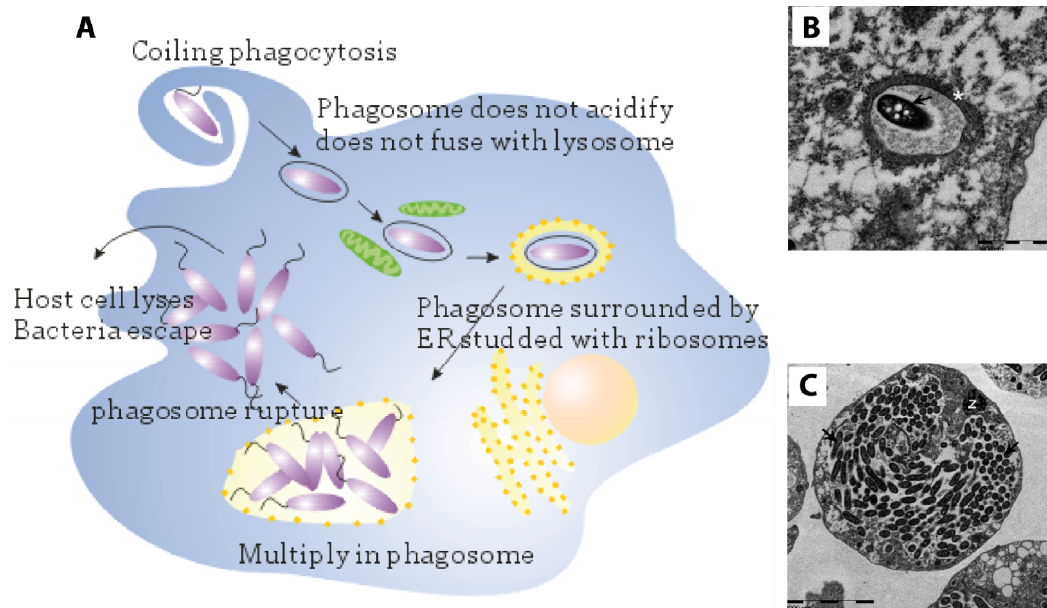


Abbildung 2.1: Übersicht des intrazellulären Infektionszyklus' von Legionellen.

Dargestellt sind die verschiedenen Stadien einer Wirtszellinfektion durch *Legionella* Bakterien (A). Nachdem die Erreger mittels Phagozytose in die Wirtszelle aufgenommen wurden (B), verhindern sie die Phago-Lysosomfusion und replizieren in einem eigens modellierten Kompartiment, der *Legionella*-enthaltenen Vakuole (C). Nach Beendigung der Vermehrung treten die Bakterien in die transmissive Phase über. Durch Lyse der Wirtszellen werden die flagellierten Legionellen entlassen, bereit einen neuen Infektionszyklus zu starten. Bildquellen: A) <http://microbewiki.kenyon.edu/images/a/a0/Legionella.png>. B+C) (89).

Die dafür notwendige Adhäsion an die Wirtszelle kann durch das „major outer membrane protein“ (MOMP), gebunden an den Komplementrezeptor C3, vermittelt werden (21). Da sich dieser jedoch nicht auf Protozoen befindet, werden komplementunabhängige Mechanismen, wie z. B. Lectinbindung (in Protozoenmembran) oder Typ IV Pili induzierte Adhäsion, diskutiert (262,290). Nicht ausschlaggebend für die Adhäsion, aber doch für eine gesteigerte Aufnahme ist das Typ IVB Sekretionssystem, welches die Schlüsselrolle der Virulenz von

Legionella pneumophila übernimmt (129). Das System wird von insgesamt 25 Genen des *icm/dot* Komplexes (*intracellular multiplication/defective for organelle trafficking*) kodiert und ist in der Lage, sowohl DNA als auch eine enorme Anzahl an Proteinen in Wirtszellen zu injizieren (96,248,293). Bis dato sind 145 verschiedene Effektorproteine beschrieben, denen, neusten Hochrechnungen zur Folge, noch einmal 150 unidentifizierte folgen könnten (51,127,196). Damit kodieren schon heute ca. 5% der offenen Leseraster des *L. pneumophila* Genoms für Effektoren des Typ IVB Sekretionssystems. Es zeigte sich, dass das System an sich für die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit essentiell ist, die meisten Effektoren alleine aber keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien im Wirtsorganismus ausüben (26,62,155,191,227). Eine Gemeinsamkeit der Effektoren liegt in der Manipulation der Wirtszelle zur Etablierung einer replikativen Nische, der *Legionella*-enthaltenen Vakuole (*Legionella-containing vacuole* = LCV). Diese weist eine besondere Morphologie auf und fusioniert vorerst nicht, wie durch das endozytotische Netzwerk vorgegeben, mit säurehaltigen Lysosomen (135,136). Die so verhinderte Degradation sichert das Überleben des Erregers.

Die Bildung der spezialisierten Vakuole beginnt schon 5min nach erfolgter Phagozytose der Bakterien. In einem Zeitraum von ca. 2h binden vermehrt, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) entstammende, Vesikel und auch Mitochondrien an der Phagosomenoberfläche und hüllen diese bis zu 98% ein (218,278). Im Anschluss erfolgt die Anlagerung von Ribosomen und die Veränderung der ursprünglichen Plasmamembran in eine ER-ähnliche Struktur. Die Abschottung der LCV durch Vesikel und Ribosomen wurde als möglicher Mechanismus zur Verhinderung der Phago-Lysosomfusion diskutiert, konnte aber experimentell nicht belegt werden, da z. B. Mutanten im *sidC* Gen oder auch *L. micdadei* kein ER rekrutieren, sich aber intrazellulär vermehren können (106,211). Dies wurde durch *icmS* oder *icmW* Mutanten bestätigt, die zur Anlagerung von ER-Vesikeln befähigt sind, trotz allem aber einer Fusion der LCV mit Lysosomen nicht entgehen können (60).

Für die Rekrutierung vesikulärer Partikel oder Störung des Transportweges wurde eine Reihe Typ IVB sekretierter Proteine beschrieben (41,96) und ihr Mechanismus und eukaryontische Interaktionspartner im Detail untersucht. Zu ihnen gehören die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) RalF und SidM/DrrA, die durch Bindung an die kleinen GTPasen ARF und Rab1 den vesikulären Transport umleiten (171,189,191). Neben der Beeinflussung sekretorischer Wege wurden andere Effektorproteine wie SidF und SdhA mit der Inhibition bzw. dem verspäteten Auslösen von Apoptose in Verbindung gebracht (16,159).

Die LCV wird solange aufrechterhalten, bis die Legionellen ihre replikative Phase abgeschlossen haben und Nährstoffe knapp werden. Mit Übergang in die transmissive Phase kommt es durch Expression zytolytischer Faktoren wie IcmT oder durch einen nicht-zytolytischen Weg, vermittelt durch LepA und LepB, zum Austritt der Bakterien aus ihrer Wirtszelle (6,57,184). Interessanterweise zeigen sich Legionellen dieser Phase neben den bereits erwähnten Merkmalen auch säureresistent. Dies ist notwendig, da Phagosomen bestimmter Zelltypen trotz anfänglicher Blockierung der Lysosomenfusion nach 12 bis 24h Infektionszeit lysosomale Marker rekrutieren und eine Absenkung des pH Wertes aufweisen (264). Die nun ausgetretenen Bakterien sind zudem flagelliert und somit in der Lage, neue Wirtszellen zu erreichen und diese als neue Replikationsnische auszubeuten.

Neben den Effektoren und ihrem Typ IVB Sekretionssystem sind weitere Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* beschrieben worden. Zu diesen zählen der „*macrophage infectivity potentiator*“ Mip und das Lsp Typ II Sekretionssystem, welches unter anderem auch hydrolytische Enzyme, wie z. B. Phospholipasen, transportiert (13,58,223). Da in der vorliegenden Arbeit eine zell-assoziierte Phospholipase von *Legionella* charakterisiert wurde, werden in den folgenden Abschnitten die Reaktionsmechanismen und Einflüsse lipolytischer Enzyme auf die Pathogenität von Bakterien näher erläutert.

2.3. Phospholipasen und Pathogenität

2.3.1. Eigenschaften und Klassifizierung von Phospholipasen

Lipasen und ihre Untergruppe, die Phospholipasen, stellen eine diverse Gruppe an Enzymen dar, die mit einer Vielzahl an Lipidsubstraten reagieren können. Dabei kommt es durch die katalytischen Eigenschaften der Enzyme zur Spaltung einer oder mehrerer Ester-Verbindungen im Lipidmolekül.

Neutrale Lipasen hydrolysieren bevorzugt Azylesterbindungen aus langkettigen Mono-, Di- oder Triglyzerolen und setzen Fettsäuren frei (202). Phospholipasen hingegen agieren vor allem mit polaren, amphipatischen Molekülen, den Phospholipiden. Diese Lipidgruppe stellt die hauptsächliche Komponente von sowohl eukaryontischen als auch prokaryontischen Zellmembranen dar. Neben der strukturgebenden Funktion übernehmen Phospholipide eine Vielzahl anderer Aufgaben, z. B. bei der Kompartimentierung von Zellorganellen, der Energiespeicherung durch Ladungstrennung (Membranpotential), der Schutz- und Atmungsfunktion als Lipidschicht im ‚Lungensurfactant‘, aber auch bei der intrazellulären Signaltransduktion durch Freisetzung von Botenstoffen („*second messenger*“) auf Lipidbasis.

EINLEITUNG

Die Anzahl an verschiedenen Lipidgruppen, z. B. Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylglyzerol (PG) und deren asymmetrische Verteilung in der Phospholipiddoppelschicht diskriminiert nicht nur Bakterien von eukaryontischen Zellen, sondern auch bakterielle Gruppen untereinander. So setzen sich die Zellmembranen von *E. coli* oder *B. subtilis* vor allem aus Phosphatidylethanolamin (PE) und PG zusammen (201), die der Legionellen enthält dagegen einen höheren Anteil an PC (~43%), dem hauptsächlichen Phospholipid der äußeren Hülle eukaryontischer Doppelschichten (73,201,257). Zur Modellierung ihrer eigenen Membranstruktur, aber auch zur aktiven Beeinflussung der Funktion ihrer Wirtszellen haben pathogene Bakterien (*Clostridium perfringens*), aber auch Pilze (*Cryptococcus neoformans*), parasitäre Protozoen (*Toxoplasma gondii*) und Viren (*Adeno-associated virus type 2*) eine Reihe phospholipolytischer Enzyme mit unterschiedlichen Substratspezifitäten entwickelt, um sich ihrer biologischen Nische entsprechend für eine erfolgreiche Vermehrung und Persistenz anzupassen (11,55,63,110,217).

Dabei können die verschiedenen Enzyme bezüglich ihrer Spaltstellen im Lipidsubstrat, aber auch auf Grund ihrer homologen Sequenzblöcke in folgende Gruppen zusammengefasst werden:

1) Klassifizierung von Phospholipasen aufgrund ihrer Substratspezifität

Es sind 4 Arten von phospholipolytisch aktiven Proteinen beschrieben, die bezüglich ihrer Spaltstelle im Lipidsubstrat durch den Anhang A-D gekennzeichnet sind. Phospholipasen A (PLA) spalten die Azylesterbindung entweder an *sn*-1 (PLA₁) oder *sn*-2 (PLA₂) Position des Lipidmoleküls, wo hingegen Phospholipasen B (PLB) an beiden Stellen wirken können (s. Abb. 2.2). Wird eine der veresterten Fettsäuren freigesetzt, entsteht ein zytotoxisches Lysophospholipid. Dieser Bestandteil kann durch eine Lysophospholipaseaktivität (LPLA) in die verbleibende Fettsäure und den Glyzerol-Phosphoesterrest hydrolysiert werden (s. Abb. 2.3). In vielen Fällen besitzen PLAs ebenfalls eine LPLA Aktivität, so z. B. die Enzyme von *L. pneumophila* oder ExoU, ein sekretiertes Toxin aus *P. aeruginosa* (13,205,270).

Phospholipasen C (PLC) und D (PLD) sind durch die Spaltung des Phosphodiesters eines Phospholipids charakterisiert (s. Abb. 2.2). Dabei setzt eine PLC das Lipidsubstrat in 1,2-Diazylglyzerol und einen Alkohol-Phosphomonoester um, die Aktivität der PLD hinterlässt hingegen Phosphatidsäure und einen entsprechenden Amino- oder Zuckeralkohol.

Phospholipase A₂ activity

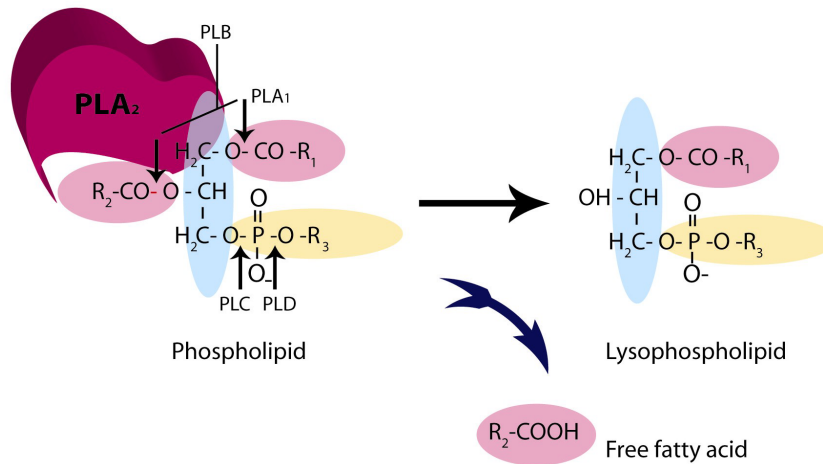


Abbildung 2.2: Strukturelle Eigenschaften eines Glycerophospholipids und die Angriffsorte der Phospholipasen A-D: Phospholipasen A und B hydrolysieren die Azylesterbindung des Lipidmoleküls, Phospholipasen C und D die Phosphoesterbindungen. Bei der Hydrolyse eines Lipids durch eine PLA₂ entstehen ein 1-Azyl-Lysophospholipid und eine freie Fettsäure. Bildquelle (22).

Lysophospholipase A activity

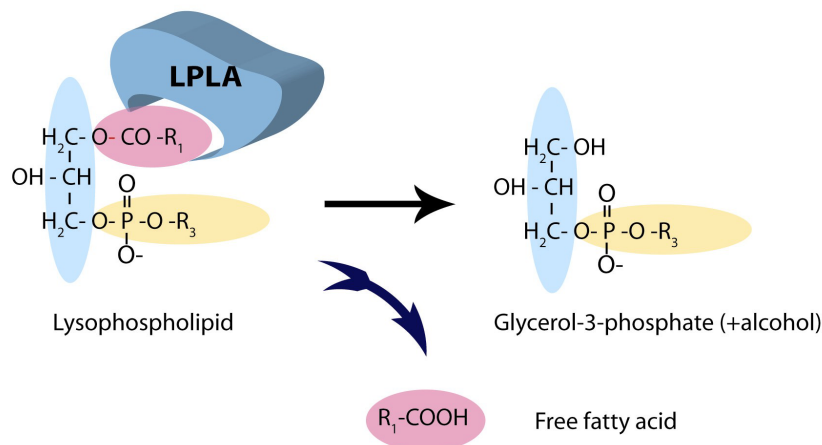


Abbildung 2.3: Angriffspunkt einer Lysophospholipase im Lipidmolekül.

Durch die Hydrolyse des Lysophospholipids mittels einer Lysophospholipaseaktivität wird die verbleibende Fettsäure freigesetzt und es entsteht Glycerol-3-Phosphat, welches einen Alkoholrest verestert an der Phosphatseitengruppe tragen kann. Bildquelle (22).

Eine weitere Untergruppe der Phospholipide stellen die Sphingophospholipide dar. Hier bildet jedoch nicht Glycerol, sondern Sphingosin das Rückgrat des Lipidmoleküls, an welches der Phosphoester gebunden ist. Bei der Spaltung von Sphingomyelin durch ein PLC entsteht so Phosphorylcholin und Ceramid, ein wichtiger „second messenger“. Als Beispiel einer

Spingomeylinase und PLC Aktivität in einem Enzym sei hier das α -Toxin von *C. perfringens* genannt (283).

2.) Klassifizierung von Lipasen anhand homologer Sequenzblöcke

Da, wie bereits erwähnt, verschiedene Aktivitäten (PLA/LPLA) in einem Enzym enthalten sein können, ist die Klassifizierung nach der Substratspezifität ein oft langwieriger Prozess. Aus diesem Grund wurde durch Arpigny und Jaeger eine weitere Einordnung der unterschiedlichen bakteriellen Enzyme anhand homologer Proteinsequenzabschnitte vorgeschlagen und insgesamt acht Familien postuliert (9). Allen Familien gemein ist das aktive Zentrum, welches aus drei essentiellen Aminosäuren gebildet wird. Diese katalytische Triade besteht aus einem nukleophilen Serin/Cystein oder Aspartat, einer sauren Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) und einem aktiven Histidinrest. Die Familie I dieser Einteilung, die der „wahren“ Lipasen, beinhaltet eine Vielzahl an Enzymen unterschiedlicher Herkunft und Größe, die im Weiteren in bis zu sechs Unterfamilien gruppiert wurden, sich aber alle durch das Vorhandensein eines konservierten Pentapeptides aus GX SXG auszeichnen. Die konservierte Domäne umschließt hier das aktive Serin einer katalytischen Triade mit Aspartat und Histidin und ist keine Besonderheit bakterieller Enzyme, sondern in vielen Lipasen eukaryontischen Ursprungs hoch konserviert (142). Mitglieder der Familie II lipolytischer Enzyme gehören den sogenannten GD SL-Hydrolasen an. Diese unterscheiden sich von der gängigen Konsensussequenz um das aktive Serin durch die aminoterminalen Aminosäureabfolge FGDSL S, die kurz als GD SL-Motiv bezeichnet wird (282). Die Sequenz ist in einem von insgesamt fünf konservierten Blöcken enthalten, die weitere essentielle Aminosäuren für die Ausbildung einer katalytischen Triade bereitstellen (43). Eine weitere Besonderheit der GD SL-Enzyme ergibt sich durch das sehr flexible aktive Zentrum, welches nach einem Mechanismus des „*induced fit*“ Modells nicht nur die Spaltung von Lipiden, sondern auch die von Proteinen erlaubt (4,164). Enzyme der Familien III bis V zeigen entweder Homologien zur Plasmalisoform der humanen „*platelet-activating factor*“ Azetylhydrolase, zu Sequenzblöcken der humanen hormonsensitiven Lipase (HSL) oder zu einer Reihe von nicht-lipolytischen Enzymen, wie z. B. Epoxidhydrolasen oder Dehalogenasen (9). Sowohl Familie IV, als auch die Mitglieder der Gruppe V werden von psychrophilen, mesophilen, aber auch thermophilen Bakterien exprimiert. Kleine Esterasen (23-26 kDa) wurden in Familie VI zusammengefasst, wo hingegen Familie VII eher aus großen Proteinen (55 kDa) und Familie VIII letztendlich aus Enzymen bestehen, die Homologien zu Klasse C β -Laktamasen aufweisen.

Die Einteilung nach Arpigny und Jaeger beinhaltet jedoch nicht eine weitere Gruppe von bakteriellen Lipasen, die stark konservierte Bereiche mit einer eukaryontischen Phospholipase A, dem Kartoffelpatatin, besitzen (8,15). Obwohl das katalytisch aktive Serin in dem weit verbreiteten Motiv GX SXG auftritt, nehmen die Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) mit der Ausbildung einer katalytischen Diade aus Serin und Aspartat eine Sonderrolle innerhalb der bakteriellen Phospholipasen ein (231). Interessanterweise kodieren Bakterien, die als Symbionten oder Pathogene eng mit der Eukaryontenzelle in Kontakt stehen auch für eine Vielzahl an PLPs (z. B. *Legionella pneumophila* = 11, *Mycobacterium tuberculosis* = 8, *Bradyrhizobium japonicum* = 8).

In dieser Arbeit konnte eine weitere Klasse an Phospholipasen begründet werden. Diese sich an die GX SXG-tragenden Familien anlehrende Gruppe sticht durch die Besonderheit der Aminosäuresequenz um das aktive Serin, THSTG, aber auch um die der katalytischen Triade zugehörigen Reste Aspartat und Histidin deutlich hervor (23).

2.3.2. Faltung und Wirkmechanismus von Phospholipasen

Bis auf wenige Mitglieder der Familie II lipolytischer Enzyme bilden die meisten Lipasen durch 8 fast parallel zueinander liegenden β -Faltblättern, verbunden mit α -Helices, die namensgebende α/β -Faltung aus (198). Charakteristisch hierbei ist der „nukleophile Ellenbogen“, der durch eine besondere Anordnung eines β -Faltblattes und der nachstehenden Helix den aktiven Serinrest regelrecht nach außen streckt (s. Abb. 2.4).

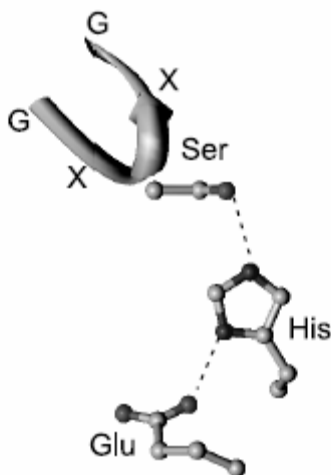


Abbildung 2.4: Übersicht der drei essentiellen Aminosäuren der katalytischen Triade und Darstellung der Position des „nukleophilen Ellenbogens“ (245).

Dargestellt ist die katalytische Triade am Beispiel der Lipase aus *Candida rugosa* mit den aktiven Aminosäuren Serin, Glutamat und Histidin. Deutlich zu sehen ist die Exposition des aktiven Serinrestes. Durch die abgeknickte Konformation des „nukleophilen Ellenbogens“ wird der nukleophile Angriff des Sauerstoffatoms sterisch unterstützt.

Trotz der Exposition des einen aktiven Restes weisen die meisten Lipasen/Phospholipasen erst eine erhöhte Aktivität auf, wenn sie mit Wasser-Lipid-Grenzflächen in Kontakt treten (46,70). Durch die sogenannte lipidinduzierte Grenzflächenaktivierung kommt es zur Konformationsänderung des PLA-Moleküls und zur Öffnung einer als „Deckel“ das aktive Zentrum bedeckenden, helikalen Struktur. Damit wird die Reaktionstasche dem Substrat zugänglich gemacht und der nukleophile Angriff durch das Sauerstoffatom des Serinrestes an das Carbonylkohlenstoffatom des Substrates kann erfolgen. Als Protonenakzeptor dient der aktive Histidinrest, der wiederum durch die negativ geladene Seitengruppe des Aspartates im Elektronenüberschuss stabilisiert wird. Das erste von zwei tetrahedralen Intermediaten, das sogenannte „*oxyanion hole*“, wird durch Rückgratatom stabilisierender Aminosäuren aufrechterhalten. Der die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmende Zerfall des Komplexes in das Azyl-Enzymintermediat und einen Alkoholrest geht anschließend durch die Bindung eines Wassermoleküls an den Carbonylkohlenstoff der Azyl-Enzymverbindung in den entscheidenden Prozess der Hydrolyse über. Durch die Ausbildung eines ähnlichen zweiten tetrahedralen Komplexes kommt es zur Abspaltung der Carbonsäure und zur Wiederherstellung des Grundzustandes des aktiven Zentrums.

2.3.3. Phospholipasen als bakterielle Virulenzfaktoren

Gegenwärtig gelangt eine Vielzahl an Phospholipasen in den Focus der Wissenschaft, da sie durch ihre hydrolysierenden Eigenschaften gegenüber Phospholipiden, dem Hauptbestandteil aller Zellmembranen, zur immensen Zellzerstörung während eines Infektionsprozesses beitragen können (s. Abb. 2.5). So ist ExoU, eine sekretierte Patatin-ähnliche Phospholipase aus *P. aeruginosa*, ein wesentlicher Bestandteil bei der Beschädigung des Lungenepithels *in vivo* (87). Es ist dabei aber nicht zu vernachlässigen, dass Phospholipasen auch indirekt, durch die Generierung von zytotoxischen Lysophospholipiden, die Membranen destabilisieren können und durch die so entstehende Ionenpermeabilität zur osmotischen Lyse der Zelle beitragen (298).

Neben der hydrolytischen Wirkung und daraus resultierender Zelllyse ist es Phospholipasen aber auch möglich, auf andere Weise Einfluss auf den Infektionsvorgang zu nehmen. Die Phospholipase PLB1 aus *Cryptococcus neoformans* trägt maßgeblich zur erfolgreichen Adhäsion des Pilzes an A549 Lungenepithelzellen bei (104). Die Autoren begründen dies in der Anreicherung von freien Fettsäuren, die wiederum die Bindeeigenschaften des Surfactant-Proteins D (SP-D) für Kohlenhydratreste des adhärierenden Pilzes positiv beeinflussen (71,104,162).

EINLEITUNG

In den vergangenen Jahren kristallisierte sich zudem ein ganz anderer Beitrag der lipolytischen Aktivität zur Virulenzsteigerung verschiedener Pathogene heraus, die Induktion immunmodulatorischer Prozesse (s. Abb. 2.5). *Clostridium perfringens* α -Toxin z. B. induziert die Expression des Endothelzell-Leukozyten-Adhäsions-Moleküls (ELAM-1), des Interzellulären-Leukozyten-Adhäsions-Moleküls (ICAM-1), des Chemoattraktants Interleukin-8 (IL-8) und der vasoaktiven Moleküle PAF und Prostazyklin (45,49). Die Akkumulation von Arachidonsäure und die daraus resultierenden Syntheseprodukte Prostaglandin, Leukotrien und Thromboxan kommen durch die Abspaltung der Carbonsäure durch Phospholipase A Aktivität zustande. ExoU, welche diese Aktivität aufweist, wurde bereits als potenter Stimulator der Arachidonsäure- und Prostaglandinakkumulation beschrieben (234).

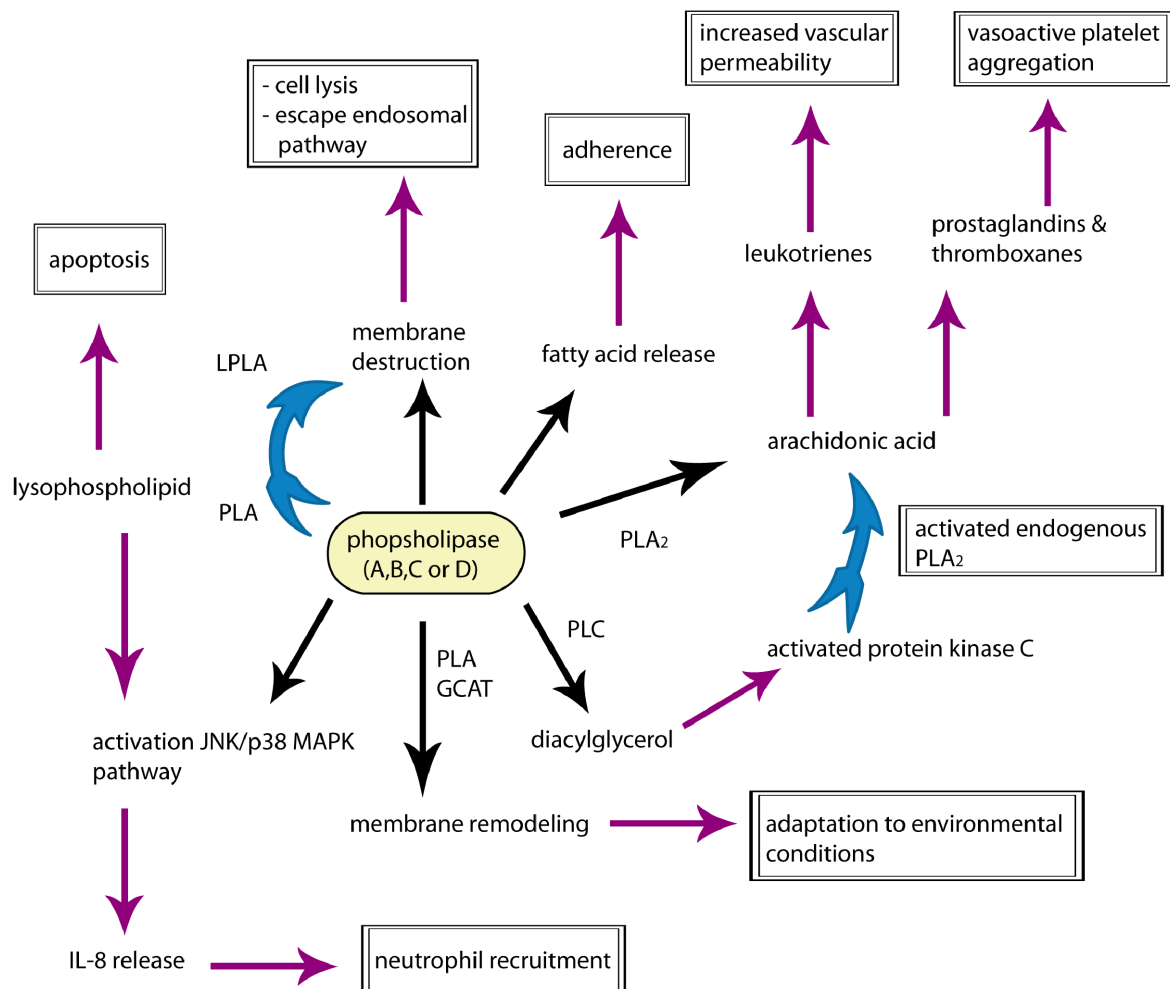


Abbildung 2.5: Übersicht der möglichen Wirkmechanismen von Phospholipasen während der Infektion von Wirtszellen.

Dargestellt sind Effekte phospholipolytischer Aktivität während des Infektionsprozesses. Schwarze und lila Pfeile markieren Produkte hydrolytischer Aktivität und die daraus resultierenden Effekte (adaptiert aus Bender and Flieger, 2009).

Bei *C. perfringens* α -Toxin, einer PLC, benötigt die Induktion der Thromboxan, Leukotrien- und Prostaglandinexpression die Aktivierung einer zellulären PLA₂ (100,182). Dies geschieht durch das Spaltprodukt Diazylglyzerol (240). Die Akkumulierung dieses Lipidsignalmoleküls kann entweder direkten Einfluss auf die Aktivierung der zellulären PLA₂ nehmen (50) oder durch eine Zwischenstufe der Stimulierung einer Proteinkinase C zur Induktion des endogenen Enzyms führen (81). Die Ausschüttung der Mediatoren wie Prostaglandin und Thromboxan erhöhen die Entzündungsreaktion, die Membranpermeabilität und Durchlässigkeit des vaskulären Systems und fördern somit die Verbreitung der pathogenen Organismen in ihrem Wirt.

Ebenfalls immunstimulierend induziert ExoU aus *P. aeruginosa* die Expression und Sekretion von IL-8, *Staphylococcus aureus* β -Toxin hingegen vermindert die Ausschüttung des Chemokins (65,268). Die Komplexität dieser Effekte zeigt, dass einige Pathogene, in Abhängigkeit von einer Phospholipase, die Zerstörung des Gewebes durch Anlockung und Aktivierung von Leukozyten vorantreiben (242), andere wiederum die zelluläre Immunantwort verhindern, um sich in ihrer geschaffenen Nische optimal vermehren zu können.

Im nachfolgenden Abschnitt werden einzelne Beispiele für Phospholipasen als Virulenzfaktoren extra- und intrazellulärer Bakterien näher vorgestellt.

2.3.3.1. Phospholipasen als Virulenzfaktoren von extrazellulären Bakterien

Extrazellulär replizierende Pathogene sehen sich einer immensen Abwehrmaschinerie ihres Wirtes gegenüber, doch werden sie teilweise nur geringfügig davon betroffen. Im Gegenzug verwenden sie die Immunstimulierung, z. B. abhängig von phospholipolytischer Aktivität, um sich an die jeweiligen Bedingungen anzupassen und eine Replikationsnische zu schaffen.

I. *Clostridium perfringens* α -Toxin fördert die Bedingungen für anaerobes Wachstum
C. perfringens, der Erreger des Wundbrandes, ist ein anaerob wachsendes, sporenbildendes Bakterium, welches durch Infektion verletzten Gewebes schwerwiegende Nekrosen hervorrufen und im Falle einer Ausbreitung der Bakterien in den Blutstrom eine Sepsis und den Tod zur Folge haben kann (279). Die Phospholipase C, auch als α -Toxin bezeichnet, wurde als der hauptsächliche Virulenzfaktor für die Entwicklung der Krankheit beschrieben (11). Insertionsmutanten des Gens zeigen reduziertes Virulenzverhalten in einem Maus-Nekrosemodell, ohne die determinierenden Anzeichen, wie z. B. ein Anschwellen und Verdunkeln der Füße, nach bakterieller Infektion. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine

Mausinfektion mit aufgereinigtem α -Toxin tödlich verlief (261). Das Enzym setzt sich aus einer N-terminalen Domäne mit PLC und Sphingomyelinaseaktivität zusammen, entwickelt seine zytolytischen Eigenschaften aber erst durch eine C-terminal vermittelte und Ca^{2+} -abhängige Membraninsertion (154,194).

Trotz der Fähigkeit zur Membranzerstörung (280) wird gegenwärtig angenommen, dass eher sublytische Mengen des Toxins die Immunantwort modulieren (281). Wie bereits erwähnt, stimuliert das Enzym die Sekretion von ELAM-1, ICAM-1 und IL-8. Es wird vermutet, dass die Sekretion dieser Mediatoren zur Anlockung und Festsetzung von Neutrophilen an der Endotheloberfläche dient und so die zell-vermittelte Zerstörung des Gewebes vorangetrieben wird (45). Interessanterweise zeigte sich schon 1917, dass Leukozyten nicht zum Ort des Geschehens vordringen und auch im Mausmodell war die Abwesenheit dieser Zelltypen an der infizierten Stelle beobachtet worden (11,279). Im Weiteren wurde festgestellt, dass α -Toxin maßgeblich an der Aggregation von Thrombozyten und Neutrophilen *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist und die Expression des thrombozytenaktivierenden Faktors (PAF) induziert (44,49,265). Zusätzlich konnte die Stimulierung der Arachidonsäurekaskade auf die Aktivität des Toxins zurückgeführt werden (115). Alles in allem kommt es so durch Störung der vaskulären Homöostase zu erhöhter Gefäßpermeabilität und durch die Aggregation der angelockten Neutrophilen und Thrombozyten zur lokalen Verstopfung des Gefäßsystems (44). Dies führt letztendlich zu den für den Gaskangrän typischen Ödemen und zur Abschottung einer anoxischen Umgebung, essentiell für die Vermehrung eines obligat anaeroben Bakteriums.

II. PldA von *Helicobacter pylori* unterstützt die Adaption des Bakteriums an das saure Milieu im Magen

Das Gram-negative, microaerophile Bakterium *H. pylori* ist mit einer Vielzahl an gastrointestinalen Erkrankungen, wie z. B. chronischer Gastritis, Magen- oder Zwölfgerdarmgeschwüren oder auch Drüsenkrebs assoziiert (77). Nach oraler Aufnahme kontaminierter Lebensmittel kolonisiert das Pathogen die Schleimhaut des menschlichen Magens und führt durch Ausschüttung einer Urease zu lokal pH neutralen Bedingungen, um sich replizieren zu können (56). Doch nicht nur die Expression von Urease wird in Zusammenhang mit der Adaption von *H. pylori* an die harschen Umweltbedingungen gebracht, sondern auch die Veränderung der eigenen Lipid- oder der LPS-Zusammensetzung (48,179). Dies ist darauf zurückzuführen, dass *H. pylori* den Anteil an Lysophospholipiden von <2% der normalen (L) Variante auf >50% in der Lyso-(S)-Variante verändern kann

(273). Die Zugabe von HCl zum Kulturmedium führte hierbei zur spontanen Ausbildung der Lysovariante mit erhöhten hämolytischen, adhesiven und invasiven Eigenschaften (48). Weiterführende Experimente zeigten, dass dies auf die Aktivierung der Phospholipase A PldA zurückzuführen ist, Mitglied einer Gruppe homologer Proteine, die in den äußeren Membranen von vielen Gram negativen Bakterien lokalisiert sind (256,272). Durch Wachstum von *H. pylori* unter sauren pH Bedingungen kommt es während der DNA Replikation zum Sprung in einem homopolymeren Abschnitt des *pldA* Gens und so zur Expression des Volllängentranskriptes, welches bereits 1999 als hämolytisches Enzym mit Phospholipase A₂ Aktivität beschrieben wurde (76,272). Hierbei zeigte sich auch, dass der generierte *pldA* Deletionsstamm in seiner Fähigkeit, Mäuse nach 2 und 8 Wochen zu kolonisieren, inhibiert war. Die immense Bedeutung von PldA im Infektionsprozess wurde 2005 noch verdeutlicht, als Tannaes und Mitarbeiter in 40 untersuchten Patientenisolaten einen direkten Zusammenhang zwischen der Phospholipaseaktivität und dem Auftreten von Magengeschwüren aufzeigen konnten (271). Dahinter steht die Vermutung, dass ein erhöhter Lysophospholipidanteil zu vermehrter Membranpermeabilität führt. Somit können pH verändernde Enzyme, wie die Urease, leichter die Membran passieren, den Protoneninflux und die Eliminierung des Bakteriums unterdrücken und zu einer toleranteren Vermehrungsumgebung beitragen (272). Dies wurde zumindest teilweise bestätigt, da Lysovarianten mit gesteigerter PldA Aktivität und höherem Lysophospholipidanteil eine erhöhte Ausschüttung von Urease in den extrazellulären Raum aufwiesen (48).

III. *Pseudomonas aeruginosa* ExoU weist zytotoxische und immunmodulatorische Eigenschaften auf

Der ubiquitär vorkommende Boden- und Wasserkeim *P. aeruginosa* zeigt ein breites Wirtsspektrum von Mensch, Tier und Pflanze auf. In immunsupprimierten oder an zystischer Fibrose leidenden Menschen können Infektionen zu schwerwiegenden Pneumonien oder septischen Erkrankungen führen und somit *P. aeruginosa* als bedeutsamen nosokomialen Erreger ausweisen (235). Nach Eintritt in die oberen Atemwege kann sich das Pathogen durch seine zytolytischen und zell-manipulierenden Eigenschaften sehr schnell im Blutkreislauf ausbreiten (149). Bei immunmodulatorischen Prozessen spielen auch die 3 bisher identifizierten Phospholipasen C eine Rolle (18,152,275), es soll im Folgenden jedoch auf die Phospholipase A ExoU eingegangen werden.

Als Effektor des Typ III Sekretionssystems (TTSS) wird ExoU direkt in die Wirtszelle injiziert, um dort durch Lipiddegradation Einfluss auf die zellulären Prozesse zu nehmen (97).

EINLEITUNG

Das Enzym wurde als zytotoxisch gegenüber einer Vielzahl an Zelltypen *in vitro* und *in vivo* beschrieben, was sich durch die Generierung einer Deletionsmutante und der damit verbundenen Abschwächung des zytolytischen Effektes bestätigen ließ (5,87,121,239,284). Zusätzlich konnten Allewelt und Mitarbeiter den nicht-zytotoxischen Stamm PA01 mit einem *exoU* exprimierenden Plasmid transformieren und so die lethale Dosis bei einer Mausinfektion um das 39-fache reduzieren (5). Dies unterstrich die Bedeutung von ExoU für eine erfolgreiche Infektion des Wirtsorganismus, trotz allem aber fehlte mehreren klinischen Isolaten das *exoU* kodierende Gen (131). Auf der anderen Seite wurde gesteigerte Virulenz von Stämmen aus krankenhausassoziiierter Pneumonie direkt der Sekretion von ExoU zugeschrieben. Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym einen zwar nicht essentiellen, dafür aber nützlichen Einfluss auf die Infektiösität von *P. aeruginosa* hat (244).

Weiterführende Studien belegten, dass es sich bei dem Enzym um ein Patatin-ähnliches Protein [s. 2.3.1 2)] mit PLA und LPLA Aktivität handelt und gezielt durch Inhibitoren zytosolischer und Ca^{2+} -unabhängiger Phospholipasen blockiert werden kann (205,238,270). Interessanterweise benötigt die Aktivierung zur Entfaltung voller zytotoxischer Aktivität von ExoU einen eukaryontischen Kofaktor, die Superoxiddismutase (237,239).

Durch die Degradation der zellulären Phospholipide kommt es zu einer ExoU-abhängigen Freisetzung von Arachidonsäure *in vitro*, zur Akkumulierung der Prostaglandine PGE(2) und PGI(2) und zum Einstrom polymorphkerniger Leukozyten sowohl in Injektions- als auch in Inhalationsexperimenten im Mausmodell (234). IL-8 als Chemoattraktant für den Neutrophileninflux konnte im Weiteren als möglicher Entzündungsmediator bestätigt werden (65). Die Gruppe um Cuzick betrachtete den Signaltransduktionsweg im Detail und konnte die Aktivierung des c-Jun N-terminalen Kinasekaskadewegs und die Bildung des AP-1 Transkriptionsfaktors auf erfolgte ExoU-Stimulierung zurückführen (65). Die Induktion dieses Weges wurde zuvor schon von einer anderen Arbeit angedeutet, in welcher die AP-1 vermittelte Expression verschiedener Gene, unter anderem von IL-6, durch ExoU Zugabe hervorgerufen wurde (181). Ein mögliches Signalmolekül zur Induktion der Kaskade konnte allerdings noch nicht identifiziert werden, jedoch kann ExoU mittels PLA Aktivität Lysophospholipide generieren, von denen LPC, aber auch LPA bereits als Induktoren der AP-1 Aktivierung beschrieben wurden (83,232). Somit sind auf der einen Seite die potenten zell-zerstörenden Eigenschaften, auf der anderen Seite die Induktion der vaskulären Permeabilität durch Ausschüttung von Prostaglandinen als auch die Akkumulierung inflammatorischer Zelltypen ausschlaggebend für die schnelle Verbreitung des Pathogens im Wirtsorganismus.

IV. *Staphylococcus aureus* β -Toxin unterdrückt die zelluläre Immunantwort

S. aureus ist ein kommensaler Keim der Hautflora und der oberen Atemwege des Menschen, wobei Nasenschleimhäute den hauptsächlichen Ort der Besiedlung darstellen. Durch Verletzungen kolonisierter Schleimhäute können die Bakterien in das durchbrochene Gewebe eindringen und sich rapide im Blutkreislauf vermehren. Dies kann zu einer Reihe von Krankheiten, wie z. B. von Hautinfektionen (Furunkel oder Pickel) bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen, wie dem toxischen Schocksyndrom, einer Endokarditis oder einer Pneumonie, führen (169). Gegenwärtig spielen vor allem krankenhausassoziierte Infektionen eine schwerwiegende Rolle, da es vermehrt zur Zunahme multiresistenter Stämme, wie z. B. einigen methicillinresistenten *S. aureus* (MRSA), kommt. Neben anderen Virulenzfaktoren, z. B. Superantigenen und weiteren Zytolysinen wie α -, γ - und δ -Toxinen, wurde β -Toxin, eine Sphingomyelinase und befähigt zur Hydrolyse von Lysophosphatidylcholin, beschrieben (75,98,141,303). β -Toxin weist zytotoxische Aktivitäten gegenüber verschiedenen Zelltypen auf und es konnte beobachtet werden, dass auf β -Toxin Stimulierung das Zytokin IL-1 β sekretiert und die Rezeptoren für IL-6 und LPS von Monozytenmembranen gelöst werden (141,173,296). Die Daten lassen eine immunmodulatorische Rolle im Infektionsprozess vermuten, welches in Einklang mit vorhergehenden Experimenten steht, bei denen Russell und Mitarbeiter eine Inhibition der Monozytenmigration nach β -Toxin Zugabe zeigen konnten (230). Zwar konnte kein Effekt auf das Anlocken von Neutrophilen beschrieben werden, neueste Studien zeigen jedoch, dass die Sphingomyelinase C durch Inhibition der IL-8 Expression die Rekrutierung dieses Zelltyps verhindert (268). Der Signalweg wurde, zumindest zum Teil, als abhängig von extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) beschrieben, wobei angenommen wurde, dass das Lipidsignalmolekül Ceramid aktiv in diesen Prozess eingreift. Im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen von *C. perfringens* PLC und α -Toxin oder ExoU aus *P. aeruginosa* ist β -Toxin nicht durch Aktivierung, sondern durch Unterdrückung einer adäquaten Immunantwort an der Pathogenität von *S. aureus* maßgeblich beteiligt.

2.3.3.2. Phospholipasen als Virulenzfaktoren von intrazellulären Bakterien

Im Gegensatz zu extrazellulären Erregern sind intrazellulär replizierende Bakterien durch die Wirtszelle von einer Reihe antimikrobieller Abwehrmechanismen geschützt. Jedoch müssen sie Strategien entwickeln, um z. B. intrazelluläre Degradation zu verhindern. Dies kann auf verschiedene Weisen und in Abhängigkeit von phospholipolytischer Aktivität geschehen, von denen einige im nachfolgenden Abschnitt beschrieben werden.

I. Die Phospholipasen C von *Mycobacterium tuberculosis* tragen zur Persistenz in Tuberkeln bei

M. tuberculosis, einer der gefährlichsten Erreger unserer Erde, fordert weltweit über 2 Millionen Todesopfer pro Jahr (28). Durch Inhalation kontaminierter Aerosole gelangen die Bazilli in die Lunge, wo sie sich in Makrophagenzellen vermehren können. Doch muss es nach erfolgter Infektion nicht unbedingt zum symptomatischen Ausbruch einer Krankheit kommen. Durch Abschirmen der Bakterien in sogenannten Tuberkeln kann der Erreger über Jahre hinweg als asymptomatische, latente Tuberkulose weitergetragen werden (235). Der Persistenz liegt ein multifaktorieller Mechanismus zugrunde, wobei die ungewöhnlich dicke Zellwand der Bakterien sie intrinsisch resistent gegenüber vielen toxischen Agenzien macht (32,133). Ein direkter Einfluss auf die Überdauerung der Erreger konnte der Regulation des eigenen Stoffwechsels und, neusten Studien zur Folge, der Bildung von Endosporen zugeschrieben werden (108,180). Interessanterweise kodiert das Genom unterschiedlicher Mycobakterien eine Vielzahl an phospholipolytischer PLC, PLD oder lysophospholipolytischer Aktivität (144,209,300,301). Bei der Deletion der von *M. tuberculosis* exprimierten Gene *plcA-D* konnte eine signifikante Reduktion des Replikationspotentials in der Lunge infizierter Mäuse beobachtet werden (213). Hierbei waren Differenzen in der Vermehrungsfähigkeit zwischen Wildtyp und der Tripel- oder Quadrupelmutante zu späteren Zeitpunkten der Infektion besonders ausgeprägt. Dies begründeten die Autoren mit einem Beitrag der Phospholipasen zur Persistenz des Erregers. Die Hypothese wird durch Experimente zum Glyoxylatzyklus unterstützt, der einen Seitenzweig des Zitratzyklus' darstellt und unter Verwertung von Acetyl-CoA Fettsäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann. Hierbei konnte demonstriert werden, dass die Isocitratlyase, ein Schlüsselenzym des Glyoxylatweges, ähnlich reguliert ist wie die „*upstream*“ der Reaktion liegenden Phospholipasen C und im Weiteren einen Einfluß auf die Persistenz der Bakterien nimmt (180). Da bereits angenommen wird, dass freie Fettsäuren als Nährstoffgrundlage von persistierenden Mycobakterien genutzt werden, könnten phospholipolytische Aktivitäten im Falle mycobakterieller Persistenz eher zur Beschaffung von Nährstoffen als zur Zerstörung des umliegenden Zellverbandes beitragen (299,301).

II. Die GDSL Lipase SseJ fördert die Umstrukturierung der „*Salmonella*-enthaltenen Vakuole“

Das Genus *Salmonella* umfasst eine Reihe pathogener Serovare, die durch Aufnahme kontaminierter Lebensmittel eine Vielzahl an Krankheiten in verschiedenen Wirtsorganismen

auslösen können. Hierbei kommt es im Menschen durch *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) immer wieder zu zwar selbstlimitierenden, aber schwerwiegenden Gastroenteriden und nur in seltenen Fällen zur Entwicklung einer Sepsis (235). Als fakultativ intrazellulärer Erreger induzieren Salmonellen ihre Aufnahme in Wirtszellen durch den Mechanismus des sogenannten „*membrane ruffling*“ und überdauern letztendlich in einer spezialisierten Nische, ähnlich zu Legionellen, in der *Salmonella* enthaltenen Vakuole (*Salmonella-containing vacuole* = SCV). Diese Art der Anpassung wird vor allem durch die zwei, auf den Pathogenitätsinseln SPI-1 und SPI-2 lokalisierten, Typ III Sekretionssysteme vermittelt (140).

Bisher konnten sowohl PLC und PLD als auch Patatin-ähnliche Proteine in *Salmonella* identifiziert werden, jedoch wurde keines hinsichtlich seiner Virulenzeigenschaften näher untersucht (15,254,310). Im Gegensatz dazu ist SseJ, ein zur Gruppe der GDSL-Hydrolasen gehörendes Enzym, als SPI-2 Typ III-Effektorprotein und Virulenzdeterminante beschrieben worden (99,197). Deletionsmutanten oder solche des katalytischen Zentrums von SseJ waren im Mausmodell als auch in Makrophageninfektionsversuchen in ihrer Vermehrungsfähigkeit attenuiert (99,161,197,229). Nach erfolgter Sekretion lokalisiert SseJ an der Vakuolenmembran und in röhrenförmigen Membranverlängerungen, den *Salmonella*-induzierten Filamenten (Sifs) (99,259). Die Funktion der Sifs ist nach wie vor unklar, jedoch vermindert eine Deletion dieser Ausdehnungen die Überlebensfähigkeit in Mausinfektionen (259). Als Antagonist des SPI-2 Effektorproteins SifA, wird angenommen, dass SseJ durch Destabilisierung dem aufbauenden Prozess der Vakuole und der Sifs entgegenwirkt und ihm so dynamische Eigenschaften verleiht. Dies konnte experimentell nachgewiesen werden, als *sifA* Mutanten nicht mehr in der Lage waren, stabile SCVs zu bilden, der Defekt aber durch die zusätzliche Deletion von *sseJ* wieder behoben werden konnte (229). Die Modellierung der Membran geschieht nach Nawabi und Mitarbeitern mittels Esterifizierung von Cholesterol durch die implizierte Funktion einer Glycerophospholipid-Cholesterol Azytransferase (GCAT) (193). Cholesterol akkumuliert bei Salmonelleninfektionen in SCVs und stellt daher ein perfektes Substrat in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem sekretierten Enzym dar (53). SseJ beeinflusst so durch Bildung von Cholesterolestern die Dynamik der SCV, um dem Erreger intrazelluläre Vermehrung und Überleben zu garantieren.

III. Phospholipasen von *Legionella pneumophila*

Ähnlich zu *M. tuberculosis* kolonisiert *L. pneumophila* nach Inhalation kontaminierter Aerosole Makrophagenzellen der menschlichen Lunge. Wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, ist

EINLEITUNG

dies jedoch nur ein unbeabsichtigter Nebenweg bakterieller Verbreitung, da sich Legionellen vor allem in frei lebenden Protozoen vermehren.

L. pneumophila kodiert für insgesamt 17 PLA Enzyme, davon 11 Patatin-ähnliche PLAs, 3 GDSL-Hydrolasen (evtl. +2) und PlaB, eine zell-assoziierte PLA/LPLA (13). Diese immens hohe Anzahl hydrolytischer Enzyme lässt auf eine enorme Bedeutung der Phospholipaseaktivität für den Überlebens- und/oder Infektionsprozess der Bakterien schließen. Als intrazellulär replizierende Pathogene kommen Legionellen in direkten Kontakt mit unterschiedlichen Phospholipiden der Wirtszellen. So stellt das Lungensurfactant die erste zu überwindende Barriere nach Inhalation der Organismen dar. Die grenzflächenaktive Substanz („*surface active agent*“) besteht bis zu 90% aus Phospholipiden und konnte bereits als Substrat für sekretierte PLA Aktivität bestätigt werden (92). Eines dieser Enzyme, genannt PlaA, zeigt zusätzlich LPLA Aktivität und ist in der Lage, die Bakterien vor den toxischen Effekten von Lysophosphatidylcholin durch Degradation des Lipids zu schützen. Daher wird diesem Protein eine protektive Rolle in den destruktiven Bedingungen während einer Lungeninfektion zugeschrieben (93). PlaA ist, ebenso wie die Enzyme PlaC und PlaD, ein Mitglied der GDSL-Hydrolasefamilie (s. 2.4.1, 2). Neben PLA/LPLA Aktivität besitzt PlaC die Fähigkeit, Azyreste auf Akzeptormoleküle, wie z. B. Cholesterol, zu übertragen, muss dazu aber mittels der Zink-Metalloprotease ProA proteolytisch aktiviert werden (14). Insertionsmutanten aller drei Enzyme zeigten jedoch keinen Defekt der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in U937 Makrophagenzellen und *Acanthamoeba castellanii* Amöben (14,93). Dieses Phänomen trifft ebenso auf das Patatin-ähnliche Protein VipD/PatA zu ((287), Aurass und Flieger, unveröffentlichte Daten). VipD wurde zeitgleich von zwei Arbeitsgruppen als Effektorprotein des Typ IVB Sekretionsapparates beschrieben und beeinflusst aller Wahrscheinlichkeit nach den Vesikeltransport der Wirtszelle (253,287). Dies wurde jedoch als unabhängig von der aktiven Patatin-Domäne des Enzyms gezeigt (253). VipD weist zudem Homologie zu dem aus *P. aeruginosa* bekannten Zytotoxin ExoU auf und könnte so in ähnlicher Weise eine immunmodulatorische Rolle während des Infektionsprozesses übernehmen (s. 2.3.3.1 III).

PlaB, eine zell-assoziierte Phospholipase A / Lysophospholipase A Aktivität von *L. pneumophila*

Wie Flieger und Mitarbeiter 2004 zeigen konnten, kodiert das *plaB* Gen für die hauptsächliche zell-assoziierte phospholipolytische Aktivität von *L. pneumophila* (94). Zudem weist das Enzym eine kontaktabhängige hämolytische Eigenschaft auf, die allerdings

EINLEITUNG

nur ca. 30% des gesamten Hämolysepotentials von *L. pneumophila* Corby gegenüber humanen Erythrozyten ausmacht. Im Infektionsmodell von *Acanthamoeba castellanii* Amöben oder auch U937 Makrophagenzellen verhielt sich die Insertionsmutante des *plaB* Gens in ihrem Replikationsvermögen analog zum Wildtyp, was auf eine weniger bedeutsame Funktion des Enzyms während des Infektionsprozesses oder auf eine Kompensation der relevanten Aufgaben durch andere Phospholipasen schließen lässt. Die Komplementation der besonders starken lipolytischen Aktivität ließ sich allerdings nicht beobachten.

Das Genom von *L. pneumophila* Corby kodiert nicht für homologe Proteine, wie es z. B. bei der GDSL-Familie der Fall ist, von denen bisher 3 (evtl. +2) verschiedene beschrieben werden konnten (212). Nur ein kurzer Sequenzabschnitt (Aminosäure 2-141) im N-terminalen Bereich von PlaB zeigt geringe Homologie und Identität von 42% und 25% zu einer Lipase, LipB genannt. Betrachtet man die genomische Umgebung des *plaB* Gens in allen vier bisher sequenzierten *L. pneumophila* Stämmen (s. Abbildung 2.6), so kann festgestellt werden, dass *plaB* stets einzeln und nicht in einem Operon kodiert bzw. transkribiert wird. Die umgebenden Gene gehören entweder verschiedenen Stoffwechselwegen an, z. B. *capP*, eine Phosphoenolpyruvat Carboxylase, oder sind noch keiner Funktion zuzuordnen.

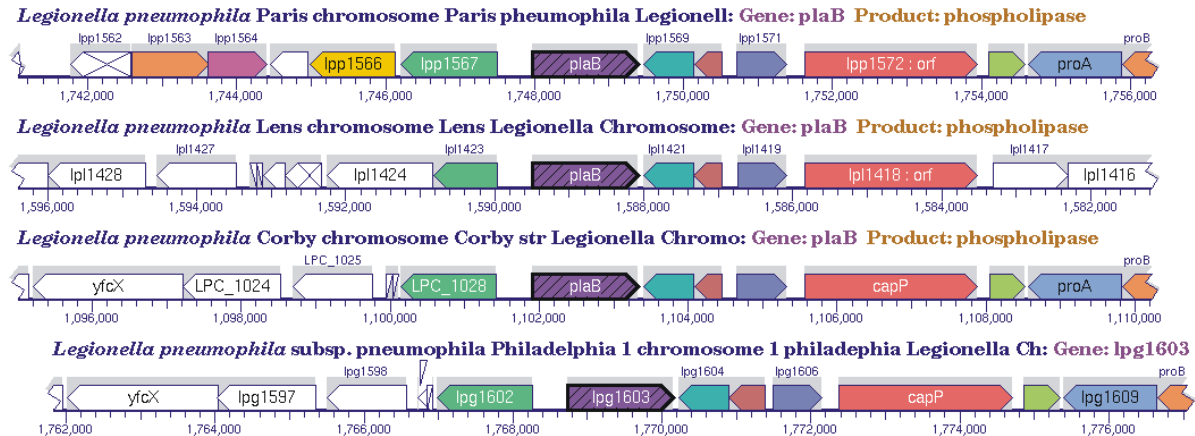


Abbildung 2.6: Genomische Situation am offenen Leserahmen (ORF) von *plaB* in sequenzierten *L. pneumophila* Stämmen.

Dargestellt sind genomische Regionen und ihre Orientierung das *plaB*-Gen (lila) umschließend. Die Software biocyc.org wurde zur Gegenüberstellung der genomischen Situation um das *plaB*-Gen der sequenzierten Stämme *L. pneumophila* Corby, Lens, Philadelphia-1 und Paris herangezogen.

Die Transkription des *plaB* Gens konnte als konstitutiv beschrieben werden, wobei es zu einer Abnahme des *plaB* Transkriptes mit Beginn der stationären Phase kommt (247). Brüggemann und Mitarbeiter bestimmten die Expression aller *L. pneumophila* Gene während einer Amöbeninfektion im Microarray-Verfahren (42). Hierbei zeigte sich ein vernachlässigbarer Anstieg des *plaB*-Transkriptes um den Faktor von 1.48 zwischen der replikativen (8h) und der transmissiven Phase (14h) einer Infektion. Die Regulation der Expression wurde weiterhin im

Detail betrachtet, wobei sich herausstellte, dass die zell-assoziierte PLA/LPLA Aktivität und damit höchstwahrscheinlich PlaB in *rpoS* und *letA* Mutanten signifikant reduziert war (39). Im Gegensatz zur Repression der *plaB* Transkription zeigt sich das PlaB-Enzym am Ende der exponentiellen Phase maximal aktiv (247), was auf zusätzliche posttranskriptionelle Regulation hinweist. Die Sequenzen des PlaB-Proteins aller sequenzierten *L. pneumophila* Stämme Corby, Lens, Philadelphia-1 und Paris sind sehr stark konserviert und weisen mindestens 98% Identität und 99% Homologie zueinander auf.

2.4. Immunabwehr einer Legionelleninfektion

Nachdem man feststellte, dass Makrophagen der A/J Mäuse suszeptibel gegenüber einer Legionelleninfektion waren, wurden erste Experimente zur angeborenen Immunität unternommen (306). Die Untersuchungen ergaben, dass ein Längenpolymorphismus im *naip5* (*neuronal apoptosis inhibitory protein 5*) Gen für diesen Effekt verantwortlich war (305). Naip5 gehört der Familie der NOD-like Rezeptoren, intrazellulärer Erkennungsmoleküle von „*pathogen associated molecular patterns*“ (PAMPs), an. Es wird vermutet, dass vor allem Naip5 und weniger der extrazellulär lokalisierte Toll-like Rezeptor 5 (TLR5) an der Erkennung von Flagellin beteiligt ist (185,216). Ebenso permissiv für Legionellainfektionen verhielten sich *Ipaf*^{-/-} Makrophagenmutanten aus Mäusen (7). *Ipaf* (*ICE-protease activating factor*) stellt ein weiteres NLR (NOD-like Rezeptor) Protein dar und könnte mit Naip5 ein Inflammasom zur ausschließlichen Erkennung von Flagellin bilden, welches anschließend durch Aktivierung der Protease Caspase-1 das Wachstum von Legionellen negativ beeinflusst (147). Jedoch geben die Daten bisher weniger Aufschluss über die tatsächliche Immunantwort im Menschen, da hier eher die konventionelle apoptotische Caspase-3 eine Rolle spielt, die die Replikation von Legionellen aber nicht inhibieren kann (105). Dies lässt auf weitere Induktionswege, stimuliert durch das *Ipaf*-Inflammasom, schließen.

Toll-like Rezeptoren sind in der Erkennung von *Legionella*-PAMPS ebenfalls von großer Bedeutung. Bisher wurden TLR5 für Flagellin (123), TLR4 im Zusammenhang mit LPS (148) und TLR2 zur Erkennung von Lipopeptiden identifiziert (3,251). Zusätzlich wurde TLR2 als Rezeptor für bakterielles LPS beschrieben. Dies ließ im Weiteren vermuten, dass TLR2 bedeutsamer für die durch Legionellen induzierte Immunantwort als der klassische LPS-Rezeptor TLR4 ist (109). Als Adaptormolekül zur Signalweiterleitung konnte vor allem MyD88 identifiziert werden. In *MyD88*^{-/-} Mäusen wurde nach Infektion mit Legionellen eine signifikant höhere Bakterienlast in der Lunge und Verbreitung dieser zur Milz beobachtet (122). Des Weiteren konnten hierbei weniger Zytokine detektiert werden, was zu einer

reduzierten Neutrophilenrekrutierung in die Alveoli führte. Neben den in dieser Arbeit detektierten Chemokinen MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) und KC (*keratinocyte-derived chemokine*) werden eine Reihe anderer inflammatorischer Faktoren auf eine Legionelleninfektion hin exprimiert und sekretiert. Diese beinhalten G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), IL-1 α (Interleukin-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- α (Interferon- α), IFN- β , INF- γ , MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), NO (Stickstoffoxid) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) (37,38,61,199,203,208,241,252,288). So ist neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch z. B. die Sekretion verschiedener Chemokine, wie IL-8 oder MCP-1, auch der Übergang zur Induktion der adaptiven Immunantwort, z. B. durch INF- γ , geschaffen. Dieses wird von T-Zellen, die unter anderem durch die Zytokine IL-12 oder IL-18 aktiviert werden, sezerniert und inhibiert mittels eines multifaktoriellen Mechanismus' das Legionellenwachstum *in vitro* (286). Die adäquate Stimulierung einer T-Zell-Antwort erfordert die Bindung eines T-Zell-Rezeptors an fremdartige Peptide, die auf dendritischen oder Makrophagen-Zellen durch die „*major histocompatibility complex*“ (MHC) Moleküle der Klasse I oder II präsentiert werden. Hierbei aktivieren MHCI Moleküle CD4 positive Helferzellen, wo hingegen MHCI präsentierte Peptide CD8 positive zytotoxische T-Zellen stimulieren. Durch die Infektion von dendritischen Zellen mit *L. pneumophila* konnte bereits die Hochregulierung der MHCI/II Proteine bewiesen werden (220). Ebenso zeigten sich Mäuse, deren CD4 und CD8 positive T-Zellen deletiert waren, wesentlich suszeptibler gegenüber einer intratrachealen Infektion mit *L. pneumophila* (266). Die MHCI-abhängige INF- γ Produktion aktivierter T-Helferzellen wurde *in vitro* im Detail untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Präsentation *Legionella* spezifischer Antigene mit der Kinetik der Phagosom-Lysosomfusion korreliert (195). Den Experimenten zur Folge erreichten *dot/icm* Mutanten zeitiger das Maximum an INF- γ Sekretion als die Ansätze der Wildtypinfektion, die erst später im Verlauf des Infektionszyklus lysosomale Marker in der LCV akquirieren und diese ansäuern (264). Dies steht mit den Anforderungen einer MHCI Präsentation in Einklang, die den Abbau der Peptide in sauren Kompartimenten erfordert, während Moleküle zur MHCI-Bindung zytosolischen Ursprungs sind.

Die zweite Seite erworbener Immunität wird durch die humorale Immunantwort repräsentiert. Anti-*Legionella* Antikörper rekrutierter B-Zellen konnten nach ca. 5 Tagen im Blutplasma infizierter Mäuse festgestellt werden (36). Bakterien, die mit diesem Antikörper prä-inkubiert wurden, zeigten eine verminderte Vermehrungsfähigkeit. Es wird vermutet, dass dies das

Resultat gesteigerter, jedoch komplementunabhängiger Phagozytose ist, welche auf noch unbekannte Weise alveoläre Makrophagen restriktiver gegenüber bakterieller Replikation macht.

2.5. Ziel der Arbeit

L. pneumophila kodiert für 17 Enzyme, denen aufgrund von Homologien oder durch experimentelle Bestimmung phospholipolytische Aktivitäten mit hoher Wahrscheinlichkeit zugewiesen werden können. Hierzu gehört auch eine zell-assoziierte Phospholipase A/Lysophospholipase A, PlaB, die zudem hämolytische Eigenschaft besitzt (94). Da sich dieses Enzym durch besonders starke Aktivität auszeichnet und zu keiner der bisher bekannten Lipasefamilien Homologie zeigt, war es in der vorliegenden Arbeit von Interesse, das Protein biochemisch und funktionell näher zu charakterisieren.

Für den Aspekt der biochemischen Analyse sollten die katalytisch aktiven Zentren identifiziert und die Substratspezifität im Hinblick auf alkoholische Seitenketten und Länge der Fettsäurereste untersucht werden. Im Weiteren sollten die hämolytischen Eigenschaften mit der katalytischen Aktivität in Zusammenhang gebracht werden. Die Rolle des C-Terminus in Bezug auf das aktive Protein sowie die PlaB-assoziierten Hydrolyseeigenschaften von nicht-*pneumophila* Stämmen oder klinischen *L. pneumophila* Isolaten sollten näher untersucht werden.

Die funktionelle Charakterisierung betreffend war es von Interesse, welchen Einfluss PlaB auf die Überlebensfähigkeit von Legionellen *in vitro*, aber auch *in vivo* zeigt. Effekte im Meerschweinchenmodell sollten anschließend in Bezug zu einer veränderten Immunantwort der Wirtszellen gebracht werden.

3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborausstattung

Tabelle 3.1: Auflistung der verwendeten Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten	Tecan Sunrise	Tecan
Chemilumineszenzimager	Chemismart 3000	Vilber Lourmat
Brutschränke	a) B20 b) HeraCell 240	Heraeus Heraeus
Drehrad	neoLab-Rotator 2-1175	neoLab
Dünnschichtkammer	DC-Glastank (Maße: 35×25×12cm)	Desaga
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Life Technologies
FPLC	ÄKTApriime	Amersham Bioscience
FT-IR-Spektrometer	IFS-28/B	Bruker
Gelelektrophorese-Apparaturen	a) Gelkammer (Mini) SubCell GT b) Spannungsgerät PowerPack 300 c) Mini Protean 3	Bio-Rad Bio-Rad Bio-Rad
Heizschüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Homogenisator	ULTRA-TURRAX T25	IKA®Labortechnik
Inkubatoren	a) InnovaTM 4230 b) InnovaTM 43 c) TH25	New Brunswick Scientific New Brunswick Scientific Edmund Bühler
Kamera	EOS 450D Spiegelreflexkamera	Canon
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Mikroskope	a) Axiovert 200M b) IMT	Carl Zeiss Jena Olympus
pH-Elektrode	Toledo MP225 pH Meter	Mettler
PCR-Cycler	a) Thermocycler T-Gradient b) FlexCycler c) 7500 Real-time PCR System	Biometra Analytik Jena Applied Biosystems
Plattiergerät	Whitley Spiral Plater	Meinrup DWS
Semidry-Elektroblotter	TE77	Pharmacia
Sterilbank	HeraSafe	Heraeus
Tisch-Schüttler	a) WT12 b) S410 c) Unimax 1010 (in Inkubator TH25)	Biometra mLw Heidolph
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin
UV/VIS Spektrophotometer	a) NanoDrop® ND-1000 b) NanoPhotometer c) DU®520 Spectrophotometer	NanoDrop Implen Beckman Coulter
UV-Transluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Vortex Mixer	Vortex Mixer 7-2020	neoLab
Waagen	a) CP64; b) 1212 MP	Sartorius AG
Zentrifugen	a) Kühlzentrifuge 5415R b) Sorvall RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge c) Labofuge400 d) Kühlzentrifuge 5810R Rotoren: A-4-62; F-34-6-38	Eppendorf Du Pont Instruments Heraeus Eppendorf

3.1.2. Spezielle Materialien

Tabelle 3.2: Auflistung spezieller Materialien

Materialbezeichnung	Name/Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller
AEX-Säulchen	HiTrap Q FF	17-6002-33	Amersham Bioscience
Cellophanfolie	Folie zur Konservierung von Proteingelen	K422.1	Roth
Chromatographie Papier	17 CHR	3017915	Whatman

MATERIAL UND METHODEN

Materialbezeichnung	Name/Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller
Cryo-Gefäße	Zur Lagerung von Glycerolgefrierkulturen	E309.1	Roth
Dünnschichtplatten	Kieselgel 60 WF254s	1.16484	Merck
Elektroporationsküvetten	Küvetten für den CellPorator	11608-031	Whatman
Filter	a) Rotilabo®Spritzenfilter 13mm	T056.1	Roth
	b) FP30/0.3 CA-S Sterilfilter	10462200	Schleicher & Schuell
FT-IR Probenrad	ZnSe Trägermaterial	A 501-B/3	Bruker
Glasröhrchen	Gefäß zur Bakterienkultivierung	231721197	Schott
Kanüle	26-gauge Sterican Gr.17	-	B.Braun (RKI Lager)
Küvetten	Einmal-Küvetten aus PMMA	P95.1	Roth
Mikrotiterplatten	96-well, F-Form	3911925	Anicrin
	Immuno-Platten, MaxiSorp, 96-well	439454	Nunc
Objektträger	Poly-L-Lysin Objektträger	L198.1	Roth
PVDF-Membran	Immobilon-P	IPVH00010	Millipore
Reaktionsgefäße	a) 1,5	0030.120.086/	Eppendorf
	2ml Safe-Lock Tubes	0030 120.094	Eppendorf
	b) PCR Tubes	683201	Greiner bio-one
	c) 15/50ml Tubes	188271/227270	Greiner bio-one
Serologische Pipetten	10/25ml, steril, BD Falcon	357530/356535	BD Bioscience
Spritze (Feindosierung)	Omnifix®-F ohne Kanüle	9161406V	B.Braun
Zellkulturflaschen	a) 25cm ²	a) 156367	Nunc
	b) 75 cm ²	b) 178891	Nunc
	c) 175 cm ²	c) 159910	Nunc
Zellkulturplatten	24-well Cellstar	662160	Greiner bio-one
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, improved	T729.1	Roth

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3.3: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid Rotiphorese® Gel 30	3029.2	Roth
Agar	101618	Merck
Agarose	V3125	Promega
Ammonium-Eisen(II)-Sulfat	F-1543	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat (APS)	0486	Amresco
Ampicillin Natriumsalz	A9518	Sigma-Aldrich
Biotin	47868	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau/Xylencyanol	B3269	Sigma-Aldrich
BSA (Rinderserum Albumin)	K41-001	PAA
BugBuster® Protein Extraction Reagent	70584-3	Novagen
Carbenicillin	69101-3	VWR
Chloramphenicol	C-1919/ C-0378	Sigma-Aldrich
Chloroform	102445	Merck
Coomassie, kolloidal (Roti®-Blue)	A152.1	Roth
3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Hydrat (DAB)	D5637	Sigma-Aldrich
Diethylether	100921	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	20385	Merck
Dithiothreitol (DTT)	P2325	Invitrogen
DNA Isolation Reagent for Genomic DNA	A3418,0050	AppliChem
dNTP, Nukleotid Mix 10mM	BIO-39043	Bioline
Eisen (III)-Chlorid	12321	Riedel-de Haën
Eisessig	100063	Merck
Ethanol, zur Analyse	100983	Merck
Ethidiumbromid	111608	Merck
FKS (Fötales Kälberserum)	A-15-043	PAA
Formalin	F8775	Sigma-Aldrich
D-(+)-Glukose	G7021	Sigma-Aldrich
Glycerol 86%	7533.3	Roth
Glyzin	3908.2	Roth
Guanidinhydrochlorid (GuHCl)	50940	Fluka
Harnstoff	3941.2	Roth
Hefeextrakt	212720	BD Bioscience

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalienbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	9105.4	Roth
n-Hexan, zur Analyse	104374	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	BIO-37036	Bioline
Kaliumchlorid	104936	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	104873	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	105104	Merck
Kaliumhydroxid Plättchen	105033	Merck
Kanamycinmonosulfat	K-1377	Sigma-Aldrich
<i>Legionella</i> α Agarplatten (BCYE)	1860e	Heipha
<i>Legionella</i> Basis Agar	110242	Merck
<i>Legionella</i> Wachstums-Supplement	SR 0110C	Oxoid
Magnesiumchlorid Hexahydrat	105833	Merck
Magnesiumsulfat Heptahydrat	105886	Merck
β-Mercaptoethanol	M7522	Sigma-Aldrich
METAFFECTENE™	T020-0.2	Biontex
Methanol	T909.1	Roth
Mucosol	60434	Brand
Naphtol Blauschwarz	195243	Sigma-Aldrich
Natriumazetat-Trihydrat	106267	Merck
Natriumazid	106688	Merck
Natriumcarbonat	106392	Merck
Natriumchlorid	3957.2	Roth
Natriumcitrat	S-4641	Sigma-Aldrich
Natriumdeoxycholat	D6750	Sigma-Aldrich
Natrium EDTA (Triplex III)	108418	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	106575	Merck
Natriumhypochlorid-Lösung	105614	Merck
Natriumthiosulfat	106512	Merck
Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid (NAD)	N1511	Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	74385	Fluka
PeqGOLD RNA Pure™	30-1020	peqLab
Pepton	LP0085	Oxoid
Petrolether	101769	Merck
Phenol	A156.2	Roth
Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	79346	Sigma-Aldrich
ProLong Gold Antifade mit DAPI	P36931	Invitrogen
2-Propanol, Isopropanol	6752.4	Roth
Protease Inhibitor Mix FY	39104.02	Serva
Reference dye (ROX)	-	Sequenzierlabor, RKI
Roti-Nanoquant (zur Proteinbestimmung)	K880.1	Roth
RPMI 1640 Pulver/Flüssig	51800-043/E15-840	Invitrogen/PMA
Salzsäure, rauchend	100317	Merck
Saponin	4185.1	Roth
Sicapent	100543	Merck
Silbernitrat	101512	Merck
Skim Milk Powder	70166	Fluka
Sodium-Dodezylsulfat (SDS)	CN30.2	Roth
Sorbitol	S3755	Sigma-Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	2367.3	Roth
Trichloressigsäure	8789.2	Roth
Tris Base	T8,760-2	Sigma-Aldrich
Triton X-100	T8787	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4%)	T8154	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	L11-004	PAA
Trypton	L47	Oxoid
Tween20	817072	Merck
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%	216763	Sigma-Aldrich
X-Gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	1161	Diagnostic Chemicals Ltd.
YNB (yeast nitrogen base)	Q300-09	Invitrogen

3.1.4. Lipidsubstrate

Tabelle 3.4: Auflistung der verwendeten Lipidsubstrate

Bezeichnung	Kürzel	Artikelnummer	Hersteller
Cardiolipin	-	840012P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	DPPC	850355P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-N-Methylethanolamin	MMPE	42558	Fluka
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-N,N-Dimethylethanolamin	DMPE	P0399	Sigma-Aldrich
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phosphoethanolamin	DPPE	850705	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-Phospho-rac-1-Glycerol	DPPG	840455P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glyzero-3-[Phospho-L-Serin]	DPPS	830037	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphat	MPLPA	857123P	Avanti Polar Lipids
1-Lauroyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	MLLPC	855475P	Avanti Polar Lipids
1-Octanoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	MOLPC	855275P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphocholin	MPLPC	855675P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phosphoethanolamin	MPLPE	856705P	Avanti Polar Lipids
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glyzero-3-Phospho-Glycerol	MPLPG	858122P	Avanti Polar Lipids
1,2-Dipalmitoyl-rac-Glycerol	1,2-DG	D2135	Sigma-Aldrich
1-Monopalmitoyl-rac-Glycerol	1-MPG	M1640	Sigma-Aldrich
Tripalmitin	TPG	T-5888	Sigma-Aldrich
3 β -Hydroxy-5-Cholesten (Cholesterol)	Chol	C-3045	Sigma-Aldrich
5-Cholesten-3-Palmitat (Cholesterolester)	CholE	C-78607	Sigma-Aldrich
Palmitinsäure	FFA	P-0500	Sigma-Aldrich

3.1.5. Puffer und Lösungen

Tabelle 3.5: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Menge/Konzentration
PBS Puffer (pH 7,2) zu 1000ml H ₂ O _{bidest}	KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl	0,2 g 0,2 g 1,15 g 8 g
Tris Puffer (pH 7,5) für Lipidanalyse	Tris Base	40 mM
Kaliumphosphatpuffer 1M, pH 6,0	K ₂ HPO ₄ (1M) KH ₂ PO ₄ (1M)	132 ml 868 ml
Puffer zur Extraktion von Nukleinsäuren		
Lysepuffer für <i>P. pastoris</i>	Tris Base Natrium-EDTA NaCl SDS Triton X-100	10 mM 1 mM 100 mM 1 % 2 %
Lysepuffer für transfizierte A549 Zellen pH 7,4	Tris Base NaCl Natrium-EDTA Triton X-100 Nonidet P-40	10 mM 150 mM 1 mM 1 % 0,5 %
Puffer für die DNA-Gelelektrophorese		
50×TAE Puffer (pH 8,0)	Tris Base Eisessig Na ₂ EDTA	2,0 M 1,0 M 0,1 M
DNA Probenpuffer	Bromphenolblau Glycerin	0,25 % (w/v) 30 %
Puffer für die „Combined Chain Reaction“ PCR		
CCR Puffer (10×)	Tris Base (pH 8,4) MgCl ₂ KCl NAD	200 mM 30 mM 500 mM 5 mM

MATERIAL UND METHODEN

Puffer/Lösung	Bestandteile	Menge/Konzentration		
Puffer für die Protein-Gelelektrophorese und Western Blot				
SDS PAGE Probenpuffer	Tris Base (pH 6,8)	62,5 mM		
	SDS	2 %		
	Glyzerol	10 %		
	β-Mercaptoethanol	5 %		
	Bromphenolblau	0,001 %		
SDS PAGE Laufpuffer (5×)	Tris Base	25 mM		
	Glyzin	384 mM		
	SDS	0,2 %		
Dehydratisierungslösung für Proteingele	EtOH	20 %		
	Glyzerin (86%)	10 %		
Western Blot Transferpuffer	Tris Base	25 mM		
	Glyzin	192 mM		
	Methanol	10 %		
Western Blot Waschpuffer (PBST-T)	1×PBS Puffer	500 ml		
	Tween20	0,1 %		
Puffer für die Protein-Silberfärbung				
Fixierlösung	Ethanol	40 %		
	Eisessig	5 %		
Sensibilisierungslösung	Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	0,2 %		
Färbelösung	Silbernitrat (AgNO ₃)	0,2 %		
Entwicklerlösung	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	2 %		
	Formalin	0,04 %		
Stopplösung	Eisessig	5 %		
Puffer zur Proteinreinigung				
Resuspensionspuffer für den Zellaufschluss	Tris Base	50 mM		
	NaCl	100 mM		
	Na ₂ EDTA	1 mM		
AEX Protein-Bindepuffer (pH 9,2)	Tris Base	20 mM		
	Na ₂ EDTA	5 mM		
AEX Protein-Elutionspuffer (pH 9,2)	Tris Base	20 mM		
	Na ₂ EDTA	5 mM		
	NaCl	1 M		
GST Glutathion-Elutionspuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM		
	Glutathion, reduziert	10 mM		
Puffer zur Reinigung und Solubilisierung von „inclusion bodies“				
IB Waschpuffer	Tris Base (pH 7,5)	50 mM		
	Na ₂ EDTA	10 mM		
	DTT	5 mM		
	Triton X-100	2 %		
	NaCl	500 mM		
IB Resuspensionspuffer	Tris Base (pH 7,5)	50 mM		
	Na ₂ EDTA	10 mM		
IB Solubilisierungspuffer	Tris Base (pH 8,0)	50 mM		
	GuHCl	6 M		
SDS-Trenngel		SDS-Sammelgel		
	10 %	12,5 %		4 %
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	3,3 ml	4,2 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30%	530 µl
1,5M Tris Base (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	0,5 M Tris Base (pH 6,8)	1 ml
H ₂ O	4 ml	3,1 ml	H ₂ O	2,4 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	10% SDS	40 µl
10% APS	100 µl	100 µl	10% APS	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	TEMED	4 µl

3.1.6. Enzyme, Standards, Antikörper

Tabelle 3.6: Auflistung verwendeter Enzyme, Standards und Antikörper

Enzymbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Ampligase	A3210K	Epicentre
Benzonase	70746	Novagen
Klenow Fragment	M0210S	NEB

MATERIAL UND METHODEN

Enzymbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller		
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich		
PCR-Sequenzierungs-Polymerase (BigDye 3.1)	4337035	Applied Biosystems		
Pfu DNA Polymerase	EP0501	Fermentas		
Platinum®Taq DNA Polymerase	10966-034	Invitrogen		
Proteinase K	D3350-02 (Kit)	Omega Bio-Tek		
Restriktionsendonukleasen	-	NEB		
RNase OUT™ Ribonuklease (RNase) Inhibitor	10777019	Invitrogen		
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	11 758 250 001	Roche		
T4 DNA Ligase	M0202	NEB		
T4 Polynukleotidkinase	M0236 S	NEB		
Taq DNA Polymerase	M0267	NEB		
Turbo™ DNase	AM2238	Ambion		
Standards für Elektrophoresen				
Standard	Bereich	Artikelnummer	Hersteller	
Gene Ruler DNA Laddermix	0,1 – 10 kb	SM0331	Fermentas	
Unstained Protein Molecular Weight Marker	14,4 – 116 kDa	SM0431	Fermentas	
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	10 – 200 kDa	SM0661	Fermentas	
Macig Mark™ XP	200 – 220 kDa	LC5602	Invitrogen	
Antikörper				
Bezeichnung (Verdünnung)	Spender	Konjugat	Artikelnummer	Hersteller/Herkunft
Anti-FlaA (1:500)	Kaninchen	-	-	Dr. Heuner
Anti-Flag (1:2000)	Maus	-	F3165	Sigma-Aldrich
Anti-GFP (1:3000)	Maus	-	G6795	Sigma-Aldrich
Anti-GST (B14) (1:1000)	Maus	-	sc-138	Santa Cruz
Anti-Kaninchen IgG (1:300)	Ziege	Alexa Fluor 488	A-11070	Invitrogen
Anti-Maus IgG (1:2500)	Ziege	HRP	A9044	Sigma-Aldrich

3.1.7. Analyse-Kits

Tabelle 3.7: Auflistung der verwendeten Analyse-Kits

Produktbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
BigDye Terminator V.3.1 Ready Cycle Sequencing Kit	4337035	Applied Biosystems
Bulk and RediPack GST Purification Modules	27-4570-01	Amersham
Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit	K160-01	Invitrogen
ECL Western blotting detection reagent	RPN2106	Amersham Bioscience
Human IL-8 ELISA Set	555244	BD Bioscience
Nefa C Kit	994-75409	Wako Chemicals
OneStep RT-PCR Kit	210212	Qiagen
<i>Pichia</i> Expression Kit	K1710-01	Invitrogen
Pro-Matrix™ Protein Refolding Guide	89867	Pierce
PURExpress™ In Vitro Protein Synthesis Kit	E6800S	NEB
RayBio® Human Inflammation Antibody Array 3	AAH-INF-3	RayBiotech, Inc.
Silver Staining Kit Protein	17-1150-01	Amersham Bioscience
T7 Sample System	L5900	Promega
Wizard Plus Minipreps	A1460	Promega
Wizard SV Gel und PCR cleanup system	A9282	Promega

3.1.8. Plasmide, Oligonukleotide, Bakterienstämme und Zellen

3.1.8.1. Verwendete Plasmide

Tabelle 3.8: Auflistung erworbener Plasmide

Plasmidbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
pBAD202/D/TOPO	K4202-01	Invitrogen
pBCKS+	212217	Stratagene
pEGFP-C2	6083-1	Clontech
pET28b (+)	69865-3	Novagen

MATERIAL UND METHODEN

Plasmidbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
pET160/GW/D-TOPO	K160-01	Invitrogen
pGEX-5X-1	27-4584-01	GE Healthcare
pGEX-6P-1	27-4597-01	GE Healthcare
pcDNA3.1(+)	V790-20	Invitrogen
pPIC3.5	K1710-01 (Kit)	Invitrogen
pPIC9	K1710-01 (Kit)	Invitrogen

Die in der folgenden Liste verwendeten *plaB* Fragmente haben, außer anderweitig angezeigt, ihren Ursprung ausschließlich in *L. pneumophila* Stamm Corby. Die Amplifikation der „site-directed“ Mutanten von PlaB (z. B. S85A) erfolgte auf Grundlage des Vektors pJB04, die der Doppelmutanten (z. B. S85A/D203N) auf pJB06-Basis.

Tabelle 3.9: Auflistung erzeugter Plasmide

Plasmid-bezeichnung	Konstrukt	Größe des Inserts (bp)	AB-Resistenz	Amplifizierungs-Primer
pJB01	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i> (Expressionskonstrukt ohne His-tag)	1685	Amp	<i>plaB_TOPO</i> f/ <i>plaB_c1-r</i>
pJB02	pBAD202/D/TOPO + <i>plaB</i> (Expressionskonstrukt + 6×His-Fusion, C-Terminal)	1446		<i>plaB_pBAD</i> f/ <i>plaB_pBAD</i> r
pJB03	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i> (Expressionskonstrukt + 6×His-Fusion, N-Terminal)	1664	Amp	<i>plaB_TOP</i> f2/ <i>plaB_c1-r</i>
pJB04	pBCKS + <i>plaB</i>	1585	Cm	<i>plaB_Sal</i> If/ <i>plaB_Eag</i> Ir (=P1/P2)
pJB06	pBCKS + <i>plaB</i> ; S85A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S85A</i>
pJB07	pBCKS + <i>plaB</i> ; S129A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S129A</i>
pJB08	pBCKS + <i>plaB</i> ; S200A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S200A</i>
pJB09	pBCKS + <i>plaB</i> ; S229A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S229A</i>
pJB10	pBCKS + <i>plaB</i> ; S250A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S250A</i>
pJB11	pBCKS + <i>plaB</i> ; D75N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_D75N</i>
pJB12	pBCKS + <i>plaB</i> ; D203N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_D203N</i>
pJB13	pBCKS + <i>plaB</i> ; H270N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_H270N</i>
pJB14	pPIC3.5 + <i>plaB</i>	1511	Amp	<i>plaB_Eco</i> f2/ <i>plaB_Eag</i> Ir
pJB15	pPIC9 + <i>plaB</i>	1511	Amp	<i>plaB_Eco</i> f2/ <i>plaB_Eag</i> Ir
pJB18	pGEX-5X-1 + <i>plaB</i> (Expressionskonstrukt mit GST-Fusion, N-Terminal)	1511	Amp	<i>plaB_Eco</i> f2/ <i>plaB_Eag</i> Ir
pJB19	pBCKS + <i>plaB</i> ; T83G	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_T83G</i>
pJB20	pBCKS + <i>plaB</i> ; D167N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_D167N</i>
pJB21	pBCKS + <i>plaB</i> ; D342N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_D342N</i>
pJB22	pBCKS + <i>plaB</i> ; D381N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_D381N</i>
pJB23	pBCKS + <i>plaB</i> ; H7N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_H7N</i>
pJB24	pBCKS + <i>plaB</i> ; H339N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_H339N</i>
pJB25	pBCKS + <i>plaB</i> ; H433N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_H433N</i>
pJB26	pBCKS + <i>plaB</i> ; H251N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_H251N</i>
pJB27	pBCKS + <i>plaB</i> ; S85A/S129A	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S85A/plaB_S129A</i>
pJB28	pBCKS + <i>plaB</i> ; S85A/D203N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S85A/plaB_D203N</i>
pJB29	pBCKS + <i>plaB</i> ; S85A/H251N	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_S85A/plaB_H251N</i>
pJB31	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i> ; verkürzte Version von PlaB, AS 1-459; GST-Fusion, N-Terminal	1390	Amp	<i>plaB_TOP</i> f2/ <i>plaB_truncC_P1</i>
pJB32	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i> ; verkürzte Version von PlaB, AS 1-388; GST-Fusion, N-Terminal	1177	Amp	<i>plaB_TOP</i> f2/ <i>plaB_truncC_P2</i>
pJB33	pGEX-6P-1 + <i>plaB</i> ; verkürzte Version von PlaB, AS 1-307; GST-Fusion, N-Terminal	941	Amp	<i>plaB_Eco</i> f2/ <i>plaB_trunc3Eag</i>
pJB36	pBCKS + <i>plaB</i> ; T83V	1585	Cm	P1/P2/ <i>plaB_T83V</i>
pJB37	pBCKS + <i>plaB</i> aus <i>L. spiritensis</i>	1445	Cm	<i>PlaB</i> spir_BamHI/ <i>PlaB</i> spir_NotI
pJB43	pcDNA3.1(+) <i>Flag</i> + <i>plaB</i>	1498	Amp	<i>plaB_fw_Xba</i> I/ <i>plaB_Eag</i> Ir
pJB46	pET28b (+) + <i>plaB</i>	1499	Amp	<i>plaB_Nde</i> I_f/ <i>plaB_Eag</i> Ir

3.1.8.2. Verwendete Oligonukleotide und Sonden

Tabelle 3.10: Auflistung verwendeter Oligonukleotide und Sonden (K=Klonierung)

Primer	Primer Nr.	Annealing-Temperatur	Sequenz	Anwendung
AOX1_f	391	54°C	5'-gACTggTTCCAATTgACAAgC-3'	Sequenzierung
AOX2_r	392	54°C	5'-gCAAATggCATTCTgACATCC-3'	Sequenzierung
β-actin fw	865	65°C	5'-CCAAGTgggACgACATggAg-3'	RT-PCR
β-actin rv	866	65°C	5'-CgTAGCCCTCgTAGATgggC-3'	RT-PCR
mip-fw	-	60°C	5'-CTTATAgCATTggTgCCgATTTggg-3'	Real-time PCR
mip-rv	-	60°C	5'-gTTCggTTAAAgCCAATTgAgCgC-3'	Real-time PCR
mip-Sonde	-	60°C	5'-FAM-TCATAgCgTCTTgCATgCCTTTAgCCA-TMR-3'	Real-time PCR
T7Promo	289	54°C	5'-TAATACgACTCACTATAggg-3'	Sequenzierung
T7Terminat	290	54°C	5'-gCTAgTTATTgCTCAGCgg-3'	Sequenzierung
pBC_a1_f	212	55°C	5-ggTTTTCCCAgTCACgA-3'	Sequenzierung
pBC_b1_r	213	55°C	5'-CgCgCAATTAACCCTCAC-3'	Sequenzierung
pGEX_fw	605	54°C	5'-gggCTggCAAGCCAgTTTggTg-3'	Sequenzierung
pGEX_rv	606	54°C	5'-CCgggAgCTgCATgTgTCAGAgg-3'	Sequenzierung
plaB_6A-f	399	60°C	5'-CACCCATggCTggAgTgTCA-3'	RT-PCR
plaB_b1-r	235	50°C	5'-CCAGTAAGTACAAAggAATAg-3'	Sequenzierung
plaB_c1-r	236	50°C	5'-TgCTATATCCAAgTgTAAGAg-3'	K pJB01/pJB03
plaB_d1 f	237	57°C	5'-gCATTgAACCgggAAAgTgTg-3'	Sequenzierung
plaB_D75N	400	56°C	5'-gATAAGCTACgAAATgggCAGCgTT-3'	K pJB11
plaB_D167N	404	56°C	5'-gAAAgCTggCTTAATTATgATTgC-3'	K pJB20
plaB_D203N	401	56°C	5'-gAATCTggATCCAAATggggTggTA-3'	K pJB12
plaB_D342N	405	56°C	5'-CACCTTATCAATTATgATCTTTACC-3'	K pJB21
plaB_D381N	406	56°C	5'-CTgACTTATTTCTTAACCTACgAT-3'	K pJB22
plaB_EagIrr	362	56-62°C	5'-gACggCCgAATTgTggCTAgATgAC-3'	K pJB04, "site-directed" Mutanten und pJB14/15/18/43/46
plaB_Ecof2	416	56°C	5'-CCggAATTCAggAgCgTTACCATgATTg-TT-3'	K pJB14/15/18/33
plaB_fl_f	239	56°C	5'-gCgATgCCTgCAAGTAAAAAg-3'	Sequenzierung
plaB_g1_r	240	55°C	5'-gATTgCCgCggTCATCAA-3'	Sequenzierung
plaB_h1_f	372	52°C	5'-gCagggTAATCTTgggTTTC-3'	Sequenzierung
plaB_H7N	407	56°C	5'-gTTATCTTCgTCAATggCTggAgT-3'	K pJB23
plaB_H251N	490	56°C	5'-CTACCTggACTTTCAAAATTCg-3'	K pJB26
plaB_H270N	402	56°C	5'-AATgCAGCCACTAACCCACgg-3'	K pJB13
plaB_H339N	408	56°C	5'-gACCgCggCAATAACCTTAT-3'	K pJB24
plaB_H433N	409	56°C	5'-CACAAAATACTTAATCCgAATgAAA-3'	K pJB25
plaB_pBADf	350	56°C	5'-AggAgCgTTATgATTgTTATC-3'	K pJB02
plaB_pBADr	351	56°C	5'-ACgAAAgAggTATCCATCTATC-3'	K pJB02
plaB_S85A	363	56°C	5'-gTATCACTCACgCTACCggTgggCC-3'	K pJB06
plaB_S129A	364	56°C	5'-CAGCTTggCAAAgCCCgCCTAg-3'	K pJB07
plaB_S200A	365	56°C	5'-ACAggAgAAgCTggATCCgATg-3'	K pJB08
plaB_S229A	366	56°C	5'-gATAACggTgAAgCTCTTgTTgTCg-3'	K pJB09
plaB_S250A	367	56°C	5'-CTACCTggACTTgCACATTCCg-3'	K pJB10
plaB_Sallf	361	56°C	5'-gATgTCgACAAgCTTgAggATTgAg-3'	K pJB04 + "site-directed" Mutanten
plaBspir2r	429	60°C	5'-gTgTAggAgTTTACggCATC-3'	RT-PCR
PlaBspir_BamHI	942	55°C	5'-gAggATCCATgATTgTTATCTTCTACAT-3'	K pJB37
plaB_NdeI_f	1271	55°C	5'-AgTCTTCATATgATTgTTATCTTCgTCCA-3'	K pJB46
PlaBspir_NotI	943	55°C	5'-gTTAgCggCCgCTCAATCTACCgTTTTTCC-3'	K pJB37
plaB_T83G	403	56°C	5'-TTgCTTgTATCggTCACTCTAC-3'	K pJB19
plaB_T83V	611	56°C	5'-TTgCTTgTATCgTICACTCTACCg-3'	K pJB36
plaB_TOPOf	241	50°C	5'-CACCTTgTgAgACAACgATTG-3'	K pJB01
plaB_TOPf2	373	55°C	5'-CACCAgCgTTATgATTgTTATCT-3'	K pJB03/31/32
plaB_truncC_P1	564	56°C	5'-TCAAAggTTgTTgCTgATACggAAA-3'	K pJB31
plaB_truncC_P2	565	56°C	5'-TCATCCACCTTCCATAATATCgTAGTC-3'	K pJB32
plaB_trunc3Eag	613	56°C	5'-ACggCCgTCAATgCTCATTCTTCTgAgTC-3'	K pJB33
plaB_fw_XbaI	947	62°C	5'-gATCTAgAATgATTgTTATCTTCgTCCA-3'	K pJB43
RTgyr_a1f	285	55°C	5'-CACATATggCCggCTTTAgAg-3'	RT-PCR
RTgyr_b1r	286	55°C	5'-TCgCgCTTgTTTTgCTgAg-3'	RT-PCR

3.1.8.3. Verwendete Bakterien, Zellen und Versuchstiere

Tabelle 3.11: Auflistung verwendeter Bakterienstämme, Hefen, Zelllinien und Versuchstiere

Bakterienstamm / Zelllinie / Tiere	Katalog-Nr.	Herkunft
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	6633	Dr. Fruth
<i>Escherichia coli</i> BL21	C161003	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	18258-012	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> XA90	-	D. Castor, ETH
<i>Escherichia coli</i> Top10	C664-55	Invitrogen
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RK1 508	-	Dr. Fruth
<i>L. anisa</i> ATCC	35292	Dr. Neumeister
<i>L. feelii</i> ATCC	35072	Dr. Neumeister
<i>L. gormanii</i> ATCC	33297	Dr. Neumeister
<i>L. jordanis</i> ATCC	33623	Dr. Neumeister
<i>L. longbeachae</i> ATCC	33462	Dr. Neumeister
<i>L. micdadei</i> ATCC	33218	Dr. Neumeister
<i>L. micdadei</i> CDC	F976	Dr. Barry Fields
<i>L. oakridgensis</i> ATCC	33761	Dr. Neumeister
<i>L. parisiensis</i> ATCC	35299	Dr. Neumeister
<i>L. pneumophila</i> Sg1 130b	BAA-74	ATCC
<i>L. pneumophila</i> Sg1 130b plaB1	-	Rydzewski, NG5, RK1
<i>L. pneumophila</i> Sg1 Corby	-	(143)
<i>L. pneumophila</i> Sg1 Corby plaB1	-	(94)
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L02-705	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L03-638	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg3 L04-41	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg3 L05-410	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L06-281	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L07-2	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L08-147	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg1 L08336	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Sg2 W08-231	-	Dr. Lück
<i>L. pneumophila</i> Wasserrohr-Isolat #251	-	Robert Koch-Institut
<i>L. sainthelensis</i> ATCC	35248	Dr. Neumeister
<i>L. spiritensis</i> ATCC	35249	Dr. Neumeister
<i>L. steigerwaltii</i> ATCC	35302	Dr. Neumeister
<i>P. aeruginosa</i> PA01	-	Dr. Häußler
<i>S. aureus</i> H1	-	Dr. Layer
<i>P. pastoris</i> GS115	K1710-01 (Kit)	Invitrogen
<i>P. pastoris</i> KM71	K1710-01 (Kit)	Invitrogen
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	30234	ATCC
U937 Makrophagen	CRL-1593.2	ATCC
A549 Epithelzellen	CCL-185	ATCC
Meerschweinchen, Stamm Hartley, männlich, ca. 250-300g	-	Charles River

3.1.9. Verwendete und erzeugte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tabelle 3.12: Auflistung verwendeter und erzeugter gentechnisch veränderter Organismen (GVO)

Bezeichnung GMO	Klon-Nr.	Konstrukt	Bemerkung
<i>E. coli</i>			
TOP10 (pJB01)	6	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB ohne tag
BL21 (pJB01)	1	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB ohne tag
TOP10 (pJB02)	4	pBAD202/D/TOPO+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit C-terminalem 6 \times His-tag
BL21	1	pBAD202/D/TOPO+ <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit C-terminalem 6 \times His-tag
TOP10 (pJB03)	1	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem 6 \times His-tag
BL21 (pJB03)	1	pET160/GW/D-TOPO+ <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem 6 \times His-tag

MATERIAL UND METHODEN

Bezeichnung GVO	Klon-Nr.	Konstrukt	Bemerkung
DH5α (pJB04)	11	pBCKS+ <i>plaB</i>	Komplementationsvektor und Kontrollvektor für „site-directed“ Mutanten von PlaB
DH5α (pJB06)	3	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A	„site-directed“ Mutante S85A
DH5α (pJB07)	2	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S129A	„site-directed“ Mutante S129A
DH5α (pJB08)	6	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S200A	„site-directed“ Mutante S200A
DH5α (pJB09)	2	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S229A	„site-directed“ Mutante S229A
DH5α (pJB10)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S250A	„site-directed“ Mutante S250A
DH5α (pJB11)	5	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D75N	„site-directed“ Mutante D75N
DH5α (pJB12)	5	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D203N	„site-directed“ Mutante D203N
DH5α (pJB13)	2	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H270N	„site-directed“ Mutante H270N
DH5α (pJB14)	3	pPIC3.5+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB in <i>P. pastoris</i> , intrazelluläre Version
DH5α (pJB15)	8	pPIC9+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB in <i>P. pastoris</i> , sekretierte Version
DH5α (pJB18)	1	pGEX-5X-1+ <i>plaB</i>	Klonierung zur Überexpression von PlaB mit N-terminalem GST-tag
BL21 (pJB18)	1 sk3*	pGEX-5X-1+ <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem GST-tag
XA90 (pJB18)	1	pGEX-5X-1+ <i>plaB</i>	Überexpression von PlaB mit N-terminalem GST-tag
DH5α (pJB19)	2 sk1*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; T83G	„site-directed“ Mutante T83G
DH5α (pJB20)	3 sk1*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D167N	„site-directed“ Mutante D167N
DH5α (pJB21)	10 sk1*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D342N	„site-directed“ Mutante D342N
DH5α (pJB22)	2 sk4*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D381N	„site-directed“ Mutante D381N
DH5α (pJB23)	4	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H7N	„site-directed“ Mutante H7N
DH5α (pJB24)	2 sk1*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H339N	„site-directed“ Mutante H339N
DH5α (pJB25)	4	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H433N	„site-directed“ Mutante H433N
DH5α (pJB26)	2	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H251N	„site-directed“ Mutante H251N
DH5α (pJB27)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/S129A	„site-directed“ Doppelmutante S85A/S129A
DH5α (pJB28)	1 sk4*	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/D203N	„site-directed“ Doppelmutante S85A/D203N
DH5α (pJB29)	2	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/H251N	„site-directed“ Doppelmutante S85A/H251N
DH5α (pJB31)	1	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-459	Klonierung verkürzter PlaB-Version; AS 1-459
BL21 (pJB31)	4	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-459	Überexpression verkürzter PlaB-Version; AS 1-459
DH5α (pJB32)	9	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-388	Klonierung verkürzter PlaB-Version; AS 1-388
BL21 (pJB32)	1	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-388	Überexpression verkürzter PlaB-Version; AS 1-388
DH5α (pJB33)	1	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-307	Klonierung verkürzter PlaB-Version; AS 1-307
BL21 (pJB33)	1	pGEX-6P-1+ <i>plaB</i> ; AS 1-307	Überexpression verkürzter PlaB-Version; AS 1-307
DH5α (pJB36)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; T83V	„site-directed“ Mutante T83V
DH5α (pJB37)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> aus <i>L. spiritensis</i>	Klonierung <i>L. spiritensis plaB</i> in pBCKS-Vektor
DH5α (pJB43)	2	pcDNA3.1(+) <i>Flag+plaB</i>	Klonierung <i>plaB</i> zur Transfektion von A549 Zellen; N-terminale Fusion zu FLAG-Epitop
DH5α (pJB46)	4	pET28b(+)+ <i>plaB</i>	Klonierung von <i>plaB</i> zur <i>in vitro</i> Translation, Shine Dalgarno 7bp vor Startkodon
<i>L. pneumophila</i>			
Corby			
Wildtyp (pBCKS)	1	pBCKS	Kontrollstamm für Versuche
plaB1 (pBCKS)	1	pBCKS	Kontrollstamm für Versuche
plaB1 (pKH192)	-	pBCKS (Heuner)	Komplementationsvektor; AS101-Substitution N→S; von Klaus Heuner
plaB1 (pJB04)	1	pBCKS+ <i>plaB</i>	Komplementationsvektor und Kontrollvektor für „site-directed“ Mutanten von PlaB
plaB1 (pJB06)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A	„site-directed“ Mutante S85A
plaB1 (pJB07)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S129A	„site-directed“ Mutante S129A
plaB1 (pJB08)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S200A	„site-directed“ Mutante S200A
plaB1 (pJB09)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S229A	„site-directed“ Mutante S229A
plaB1 (pJB10)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S250A	„site-directed“ Mutante S250A
plaB1 (pJB11)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D75N	„site-directed“ Mutante D75N
plaB1 (pJB12)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D203N	„site-directed“ Mutante D203N
plaB1 (pJB13)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H270N	„site-directed“ Mutante H270N
plaB1 (pJB19)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; T83G	„site-directed“ Mutante T83G
plaB1 (pJB20)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D167N	„site-directed“ Mutante D167N
plaB1 (pJB21)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D342N	„site-directed“ Mutante D342N
plaB1 (pJB22)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; D381N	„site-directed“ Mutante D381N
plaB1 (pJB23)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H7N	„site-directed“ Mutante H7N
plaB1 (pJB24)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H339N	„site-directed“ Mutante H339N
plaB1 (pJB25)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H433N	„site-directed“ Mutante H433N
plaB1 (pJB26)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; H251N	„site-directed“ Mutante H251N

MATERIAL UND METHODEN

Bezeichnung GVO	Klon-Nr.	Konstrukt	Bemerkung
plaB1 (pJB27)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/S129A	„site-directed“ Doppelmutante S85A/S129A
plaB1 (pJB28)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/D203N	„site-directed“ Doppelmutante S85A/D203N
plaB1 (pJB29)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; S85A/H251N	„site-directed“ Doppelmutante S85A/H251N
plaB1 (pJB36)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> ; T83V	„site-directed“ Mutante T83V
plaB1 (pJB37)	1	pBCKS+ <i>plaB</i> aus <i>L. spiritensis</i>	Expression von <i>L. spiritensis plaB</i> in pBCKS-Vektor
<i>P. pastoris</i>			
Pp01	1-3	pPIC9+ <i>plaB</i>	Überexpression und Sekretion von PlaB in <i>P. pastoris</i> GS115
Pp02	1	pPIC9+ <i>plaB</i>	Überexpression und Sekretion von PlaB in <i>P. pastoris</i> KM71
Pp03	1/2	pPIC3.5+ <i>plaB</i>	Intrazelluläre Überexpression von <i>plaB</i> in <i>P. pastoris</i> GS115
Pp04	1/2	pPIC3.5+ <i>plaB</i>	Intrazelluläre Überexpression von <i>plaB</i> in <i>P. pastoris</i> KM71

*Anmerkung: Einige Stämme sind nach erneutem Ausstreichen für die Herstellung von Glycerolgefrierkulturen nur in Einzelkolonien gewachsen. Daher wurde von den Einzelkolonien erneut eine Kolonie-PCR durchgeführt und positive Klone als Subklone (=sk) weggefroren. Diese zeigten kein verändertes Wachstumsverhalten mehr und wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

3.1.10. Kulturmedien für Bakterien und Zellen

Tabelle 3.13: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *L. pneumophila*

BYE-Flüssigmedium (BYE: Buffered Yeast Extract)	BCYE-Agar-Platten (BCYE: Buffered Charcoal Yeast Extract)
10 g Hefeextrakt 14,45 g <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement: 10 g ACES Puffer 2,8 g KOH 1,0 g α -Ketoglutarat-Monoessigsäure-Salz 0,4 g L-Cystein HCl H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Das <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement wurde mit Hefeextrakt in H ₂ O _{bidest} gelöst und steril filtriert.	27,5 g <i>Legionella</i> Basis-Agar: 10 g Hefeextrakt 1,5 g Aktivkohle 16 g Agar 14,45 g <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement: 10 g ACES 2,8 g KOH 1,0 g α -Ketoglutarat-Monoessigsäure Salz 0,4 g L-Cystein HCl H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Der <i>Legionella</i> Basis Agar wurde in H ₂ O _{bidest} suspendiert und autoklaviert. Das <i>Legionella</i> Wachstums-Supplement wurde wie beschrieben angesetzt und nach dem Autoklavieren steril bei 50°C zugegeben.

Tabelle 3.14: Auflistung der Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

Luria-Bertani (LB)-Flüssigmedium	Luria-Bertani (LB)-Agar-Platten
10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Die Bestandteile der beiden Medien wurden zunächst in H ₂ O _{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 15 g Agar H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Die Bestandteile wurden zunächst in H ₂ O _{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.
SOB-Medium (pH 7,0) (Super Optimal Broth Medium)	SOC-Medium (Super Optimal Broth-Derivat)
20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,584 g NaCl 0,186 g KCl H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Die Bestandteile wurden zunächst in H ₂ O _{bidest} gelöst und anschließend autoklaviert.	98 ml SOB-Medium 1 ml 2M Mg ²⁺ Stammlösung (20,33 g MgCl ₂ × H ₂ O und 24,65 g MgSO ₄ × 7 H ₂ O je 100ml Stammlösung) 1 ml 2M Glukose Stammlösung (36,04 g Glukose je 100 ml Stammlösung) Vor der Zugabe der Lösungen zum SOB-Medium wurde die Mg ²⁺ -Stammlösung autoklaviert und die Glukose-Stammlösung steril filtriert.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3.15: Auflistung der Nährmedien zur Anzucht von *P. pastoris*

YPD Kulturmedium (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)	MD Selektivagar (Minimal Dextrose Medium)
10 g Hefeextrakt 10 g Pepton 20 g Dextrose (Glukose) optional: 20 g Agar für Festmedium H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Hefeextrakt und Pepton wurden in H ₂ O gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die steril filtrierte Glukoselösung zugegeben.	100 ml 10× (13,4%) YNB 2 ml 500× (0,02%) Biotin 100 ml 10× (20%) Glukose 20 g Agar H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Wasser und Agar wurde vor Zugabe der steril filtrierte Bestandteile autoklaviert.
BMGY/BMMY Kulturmedium (Buffered Glycerol or Methanol-complex-Medium)	
10 g Hefeextrakt 20 g Pepton 100 ml 1M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0 100 ml 10× (13,4%) YNB 2 ml 500× (0,02%) Biotin 100 ml 10× (10%) Glyzerol oder 100 ml 10× (5%) Methanol H ₂ O _{bidest} zu 1000 ml Hefeextrakt, Pepton und H ₂ O wurden vor Zugabe der steril filtrierte Bestandteile autoklaviert.	

Tabelle 3.16: Auflistung verwendeter Nährmedien zur Anzucht von *A. castellanii* und zur Infektion der Amöben mit *L. pneumophila*

PYG Kulturmedium (Peptone-Yeast Extract-Glucose)	Infektionsmedium
20 g Pepton 1 g Hefeextrakt 10 ml 400mM MgSO ₄ × 7 H ₂ O 10 ml 40mM CaCl ₂ × 2 H ₂ O 10 ml 250mM Na ₂ HPO ₄ × 7 H ₂ O 10 ml 250mM KH ₂ PO ₄ 10 ml 5mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ × 6 H ₂ O 2,5 g NaCitrat × 2 H ₂ O 50 ml 2M Glukose 900 ml H ₂ O _{bidest}	Bestandteile wie PYG Kulturmedium ohne Pepton, Hefeextrakt und Glukose Alle Bestandteile, außer Glukose, wurden in H ₂ O _{bidest} gelöst und autoklaviert. Anschließend wurde die steril filtrierte Glukoselösung dazugegeben.

Tabelle 3.17: Auflistung des Nährmediums für die Kultivierung und Infektion von U937 Makrophagen und A549 Lungeneithelzellen

RPMI Kultur- und Infektionsmedium mit 10 % FKS (Roswell Park Memorial Institute Medium)
RPMI 1640 Pulver oder Flüssigmedium 10 % hitzeinaktiviertes FKS Das Medium wurde nach Angaben des Herstellers angesetzt.

Tabelle 3.18: Auflistung verwendeter Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration für <i>L. pneumophila</i> (µg/ml)	Endkonzentration für <i>E. coli</i> (µg/ml)
Ampicillin (Amp)	100 g/l H ₂ O _{bidest}	-	100
Carbenicillin (Carb)	100 g/l H ₂ O _{bidest}	-	100
Chloramphenicol (Cm)	30 g/l EtOH	6	30
Kanamycinmonosulfat (Km)	50 g/l H ₂ O _{bidest}	25	50
Die Stammlösungen wurden steril filtriert, Aliquots bei -20°C gelagert und den autoklavierten Medien in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.			

3.1.11. Verwendete Software

Tabelle 3.19: Verwendete Software und Internet-Datenbanken

Datenbank	Adresse
Biocyc	http://www.biocyc.org/
COILS Server	http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html
Compute pI/MW tool	http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html
Kyte-Doolittle Hydropathy Plot	http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
PEDANT	http://pedant.gsf.de/
ProtCompB	http://linux1.softberry.com/berry.phtml
PSITE	http://linux1.softberry.com/berry.phtml
Sequenz-Alignment	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
SignalP 3.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Programme	Hersteller
Acolyte (Koloniezählprogramm)	Synbiosis
Bio 1D	Vilber Lourmat
Lasergene 8	DNASTAR, Inc.
Magellan V5.03	Tecan
Opus 5.0	Bruker
Origin 8.0	OriginLab
PrimeView & PrimeView Evaluation	Amersham
Prism 5	GraphPad Software, Inc.
Quantity One	Bio-Rad
RayBio® Human Inflammation Antibody Array III and 3.1	RayBiotech, Inc
Analysis Tool	

3.2. Methoden

3.2.1. Anzucht von Bakterien und Hefen

3.2.1.1. *Legionella pneumophila*

Bei -80°C gelagerte Legionellen wurden mittels einer sterilen Impföse auf BCYE α Agar ausgestrichen („Mutterplatte“) und nach 2 Tagen Inkubation bei 37°C entweder für ca. 1 Monat bei 4°C gelagert oder wiederum auf BCYE α Agar überimpft („Tochterplatte“). Die *plaB* Kanamycinresistenzkassetten-Insertionsmutante von *L. pneumophila* wurde zuerst auf antibiotikahaltigen (s. Tabelle 3.18) Mutterplatten ausgestrichen, zur weiteren Verwendung aber auf BCYE α -Platten ohne Antibiotikum kultiviert. Plasmidtragende Bakterien wurden grundsätzlich auf BCYE-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikakonzentrationen angezogen (s. Tabelle 3.18).

Für Infektionen wurden die Kulturen für 2 bis 3 Tage bei 37°C auf Festagar inkubiert. Flüssigkulturen hingegen wurden auf Festmedium für 1 1/2 Tage bei 37°C bebrütet und anschließend zum Animpfen einer Vorkultur in BYE-Nährbouillon mit/ohne Antibiotika verwendet. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Nach photometrischer Bestimmung der optischen Dichte bei 660nm wurde die Hauptkultur auf eine OD₆₆₀ von 0.3-0.4 eingestellt und unter Schütteln bis zur späten (OD₆₆₀ ~2,0) exponentiellen Phase kultiviert.

Zur Herstellung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen für Aktivitätstests erfolgte die Zellernte mittels Zentrifugation bei $5.000 \times g$ für 5min. Kulturüberstände wurden mit 1/50 Volumen an 300mM NaN₃ versetzt und bei 4°C, Bakterienpellets bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

3.2.1.2. *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* Wildtypen (s. Tabelle 3.11) und die der mit Plasmiden transformierten Stämme (s. Tabelle 3.12) erfolgte aus Glyzerolstockkulturen (s. 3.2.1.4) auf entsprechenden LB-Agarplatten für 18-24h bei 37°C. Ebenso wie bei *L. pneumophila* wurden *E. coli* Stämme auf Tochterplatten überimpft, davon Vorkulturen inokuliert und anschließende Hauptkulturen bei Erreichen einer OD₆₆₀ ~2.0 geerntet. Die Induktion der Expression eines *in trans* enthaltenen Gens erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1mM) zu Beginn der frühen exponentiellen Phase (OD₆₆₀ der Kultur von 0,6 bis 0,8). Die Expression wurde für 4h bei 37°C fortgeführt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation geerntet und weiterverarbeitet (s. 3.2.1.4).

Zur Anzucht der *E. coli* Zellen für die Präparation von extrachromosomaler DNA wurden entsprechende Kolonien gepickt und auf eine frische antibiotikahaltige LB-Agarplatte überimpft, bevor diese zur Inokulation der Präparationskultur verwendet wurde. 2ml einer Übernachtskultur (OD₆₆₀ ca. 2,5) wurden pelletiert und anschließend die plasmidale DNA extrahiert (s. 3.2.3.3).

3.2.1.3. *Pichia pastoris*

Nach Wachstum auf YPD- oder MD-Selektiv-Agarplatten (s. Tabelle 3.15) für 24h erfolgte die Kultivierung von *P. pastoris* bei 250rpm und 30°C (Tischinkubator) in YPD-Flüssigmedium zur Extraktion chromosomaler DNA. Für die Überexpression erfolgte die Anzucht der Vorkulturen in BMGY, bevor die Zellen zur Induktion der Proteinexpression bei OD₆₆₀ von 4 bis 5 geerntet ($5.000 \times g$, 5min) und auf eine Ausgangssuspension von OD₆₆₀ ~0,9 in BMMY-Flüssigmedium eingestellt wurden. Methanol wurde im 24h-Takt zu einer Endkonzentration von 0,5% des Kulturvolumens zugegeben, um die Expression des Zielproteins aufrecht zu erhalten.

3.2.1.4. Herstellung von Glyzerolgefrierkulturen

Zur Erzeugung von Langzeitkulturen wurden *L. pneumophila*, *E. coli* und *P. pastoris* (s. Tabelle 3.12) 1-2 Tage auf den zugehörigen Selektivagarplatten angezogen, bis sich ein gut bewachsener Rasen gebildet hatte. Anschließend wurde eine volle Impföse des jeweiligen

Stammes in der zugehörigen Nährbouillon ohne Antibiotika resuspendiert und im Volumenverhältnis 1:1 mit sterilem Glycerol vermischt. Die Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80°C.

3.2.2. Anzucht von A549 Lungenepithelzell-, U937 Makrophagen- und *Acanthamoeba*- Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Kulturmedium (PYG bzw. RPMI) + 10% DMSO eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und 2min bei $1.000 \times g$ zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium resuspendiert und erneut bei $1.000 \times g$ für 10min pelletiert. Daraufhin wurden die Zellen erneut in Kulturmedium resuspendiert (10ml) und in ein Kulturgefäß überführt. Nach 3 (*A. castellanii*) bzw. 10 Tagen Inkubation (U937, A549) bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen erstmalig passagiert. Anschließend wurden die Zellen in Intervallen von 3 bis 4 Tagen regelmäßig passagiert (maximal 30-mal), wobei das Verhältnis von 1:10 bis 1:12 (v/v), Zellen zu Wachstumsmedium, bei den jeweiligen Inkubationslängen berücksichtigt wurde.

3.2.3. Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.3.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus Lungengewebe

Zur quantitativen Bestimmung der Bakterienlast mittels real-time PCR Analyse, wurden 50mg Lungengewebe von allen Tieren, dies entsprach 50µl Homogenisat, mit 1ml des „*DNA Isolation Reagent for Genomic DNA*“ (AppliChem) vermischt. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers, mit Ausnahme, dass die präzipitierte DNA nicht sedimentiert, sondern mittels einer sterilen Pipettenspitze in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Nach Zugabe von 100µl H₂O wurde die DNA über Nacht bei 55°C inkubiert, um eine maximale Löslichkeit der Nukleinsäure zu erreichen.

3.2.3.2. Isolierung von chromosomaler DNA aus *P. pastoris*

Nach der Methode von Harju *et al.* (120) wurden 2ml einer Übernachtskultur pelletiert ($16.000 \times g$, 2min) und in 200µl Lysispuffer (s. Tabelle 3.5) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte nach der „*freeze and thaw*“-Methodik. Hierzu wurden die Ansätze abwechselnd in flüssigen Stickstoff getaucht, bis die Lysate komplett gefroren waren, und anschließend in einem 95°C warmen Wasserbad wieder zum Auftauen gebracht. Nach dreimaligem Wiederholen des Vorganges und abschließendem starken Vortexen für 30sek, wurden die Ansätze mit 200µl Chloroform vermischt, erneut für 2min geschüttelt (Vortexer Mixer) und für 3,5min bei $16.000 \times g$ und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase

wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 400µl eiskaltem EtOH vermischt und für 5min bei RT inkubiert, um die Präzipitation des Nukleinsäurekomplexes zu ermöglichen. Die Pelletierung der DNA erfolgte für 6min bei $16.000 \times g$ (RT). Erhaltenes Präzipitat wurde 1× mit 500µl an 70%igem (v/v) EtOH gewaschen, erneut 4min bei $16.000 \times g$ zentrifugiert und im 37°C-Inkubator getrocknet. Die Konzentration der in 30µl H₂O solubilisierten DNA wurde anschließend bei 260nm im Spektrophotometer (Nanodrop-Gerät) bestimmt. Die Lagerung der Nukleinsäure erfolgte bei -20°C.

3.2.3.3. Isolierung von extrachromosomaler DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels des Kits „*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*“ der Firma Promega nach dem Protokoll des Herstellers. Die hiermit gewonnene DNA wurde quantitativ durch Messung der optischen Dichte bei 260nm im Spektrophotometer bestimmt und für weitere Experimente wie z. B. der „*site-directed*“ Mutagenese, Restriktion durch Endonukleasen und Sequenzierreaktionen verwendet.

3.2.3.4. RNA-Isolierung

Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des peqGOLD RNAPure™ Reagenz (PeqLab), einer optimierten Guanidinisothiocyant/Phenol-Methode zur Extraktion von RNA humanen, tierischen und bakteriellen Ursprungs. Hierbei wurde, nach Angaben des Herstellers, 1ml peqGOLD RNAPure™ zu 500µl einer Bakterienkultur der OD₆₆₀=2, oder 1ml der Reagenz pro well einer 24-well Zellkulturplatte zugegeben und mit dem empfohlenen Protokoll fortgefahren. Isolierte RNA wurde in 40µl H₂O gelöst und quantitativ/qualitativ im Spektrophotometer untersucht.

3.2.4. Fällung von Nukleinsäuren mittels EtOH

Um nach erfolgter Ligation von Fragmenten reine und aufkonzentrierte DNA zu erhalten, wurde die Nukleinsäure mittels EtOH gefällt. Die zu fällende Lösung wurde mit einer Endkonzentration an 0,3M Natriumazetat pH7,0 und dem doppelten Volumenanteil an unvergälltem 95%igem (v/v) EtOH vermischt und anschließend für 15min bei $16.000 \times g$ und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das unsichtbare DNA-Präzipitat mit 70% (v/v) EtOH versetzt und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend für ca. 15min bei 37°C getrocknet, in 2µl sterilem 10%igem (v/v) Glycerol aufgenommen und sofort in *E. coli* DH5α transformiert.

3.2.5. Nukleinsäure-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte mittels 1 bis 2%igen (w/v) Agarosegelen in 1×TAE-Puffer. Die Proben wurden mit etwa 0,2 Volumenanteilen Probenpuffer (s. Tabelle 3.5) versetzt und bei 105 bis 140V bis zur angestrebten Laufstrecke aufgetrennt. Die anschließende Färbung der Nukleinsäurebanden erfolgte für ca. 20 Minuten im Ethidiumbromid-Bad (2µg/ml EtBr in 1×TAE) und wurde im UV-Transluminator bei 254nm dokumentiert.

Bei präparativen Gelen wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und unter Verwendung des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*“ eluiert.

3.2.6. Modifikation von Nukleinsäuren

3.2.6.1. Verdau mit Restriktionsendonukleasen/Dephosphorylierung

Die Restriktion mittels Typ II Restriktionsendonukleasen erfolgt spezifisch innerhalb ihrer, meist palindromer, Erkennungssequenz an doppelsträngiger DNA. Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) erworben und mit den zugehörigen Puffern in die jeweiligen Reaktionen eingesetzt. Für den Verdau von 1µg DNA wurden 10U an Enzym in einem Reaktionsvolumen von meist 20µl verwendet und für 2-12h bei 37°C (Temperatur ist abhängig von dem verwendeten Enzym) inkubiert. Zur Überprüfung erfolgter Restriktion wurden die Fragmente auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt.

Wenn von Interesse, wurde der geschnittene Vektor mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase (Schrump Alkaline Phosphatase, SAP, Roche) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu minimieren. Hierzu konnte der hitzeinaktivierte Restriktionsenzym/DNA-Mix ohne einen zusätzlichen Reinigungsschritt verwendet werden. Nach Zugabe von SAP-Puffer und 1U an SAP-Enzym wurde der Ansatz 60min bei 37°C inkubiert und anschließend für 15min bei 65°C inaktiviert.

Um die Puffer- und Enzymreste zu entfernen, wurden die Fragmente mittels des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*“ (Promega) entweder direkt aus dem PCR-Ansatz oder nach erfolgter Elektrophorese aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Die Konzentrationsbestimmung für anschließende Ligationsansätze (s. 3.2.6.2) wurde mit Hilfe des Nanodrop-Gerätes durchgeführt.

3.2.6.2. Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der DNA Ligase des Bakteriophagen T4. Dabei wurde die Ligation meist in einem Reaktionsvolumen von 10µl durchgeführt. Ungefähr

50ng an Vektor-DNA wurde im molaren Verhältnis von 1:3 mit dem zu insertierenden DNA-Fragment vermischt und unter Zugabe von 400U T4 DNA Ligase für 15-18h bei 16°C oder für 3h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 10min bei 65°C hitzeinaktiviert und mittels EtOH-Fällung (s. 3.2.4) für die Transformation in die jeweiligen Bakterienstämme vorbereitet.

3.2.6.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der exponentiellen Amplifikation von Nukleotid-Fragmenten. In dieser Arbeit wurde zu Klonierungszwecken die DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* DNA-Polymerase) und zur Überprüfung positiver Klone, mittels Kolonie-PCR, die DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA-Polymerase) verwendet. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 25µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 3.20: Reaktionsansatz für eine Standard- und Kolonie-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	1 Kolonie (Kolonie-PCR) oder 20-200 ng DNA	-	-
Puffer	2,5	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTPs	0,25	10 mM jedes dNTP	0,1 mM jedes dNTP
Oligonukleotid 1	0,25	50 µM	0,5 µM
Oligonukleotid 2	0,25	50 µM	0,5 µM
DNA-Polymerase	1µl (<i>Pfu</i>) oder 0,25µl (<i>Taq</i>)	2,5 U/µl oder 5 U/µl	0,1 U/µl oder 0,05 U/µl
steriles H ₂ O	zu 25µl Gesamtansatz	-	-

Die Annealingtemperatur wurde den Oligonukleotiden spezifisch angepasst. Für die Kolonie-PCR wurden die zu untersuchenden Zellen vor der PCR mit PCR-Puffer und Wasser für 10min bei 99°C lysiert. Anschließend wurde der Enzym-Primer-Mix zugegeben und folgendes Standard-Programm zur Amplifikation der gewünschten Produkte verwendet:

Tabelle 3.21: Programm für eine Standard- und Kolonie-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	95°C	4 min
2. Denaturierung	30	95°C	40 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	30	50-65°C	40 sek
4. Synthese (Elongation)	30	72°C	1-2 min
5. Finale Elongation	1	72°C	10 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 1%igen (w/v) Agarosegelen elektrophoretisch überprüft und gegebenenfalls weiter gereinigt.

3.2.6.4. Einfügen von Punktmutationen mittels „*Combined Chain Reaction*“ (CCR)

Für die zielgerichtete Substitution von Basenpaaren wurde die Methode der „*Combined Chain Reaction*“ (CCR) nach Bi und Stambrook angewendet (27). Bei dieser speziellen Art der PCR-Technik wird ein dritter Primer, der die gewünschte Mutation trägt, zu dem PCR-Ansatz gegeben und im laufenden Syntheseprozess von einer thermostabilen Ligase (Ampligase) mit dem fortlaufenden Nukleotidstrang verknüpft. Um dies zu ermöglichen, muss das Oligonukleotid am 5'-Ende phosphoryliert sein. Die Phosphorylierungsreaktion von insgesamt 500pmol an Mutageneseprimer wurde in 1× T4 DNA-Ligasepuffer und 5U an T4 Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 20µl für 1h bei 37°C durchgeführt. Die Reinigung des hitzeinaktivierten (20min bei 65°C) Ansatzes erfolgte mittels EtOH-Fällung (s. 3.2.4). Das Pellet wurde in 30µl sterilem H₂O resuspendiert und auf eine Endkonzentration von 20ng/µl an phosphorylierten Oligonukleotiden für die anschließende CCR Reaktion eingestellt. Zur Herstellung von Einfachmutanten wurde pJB04 als Ausgangsplasmid gewählt, für die Doppelmutanten diente pJB06 (S85A-PlaB) als Amplifikationsgrundlage.

Tabelle 3.22: Reaktionsansatz für eine „*Combined Chain Reaction*“ (CCR)

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
Plasmid pJB04/pJB06	1	20 ng/µl	1 ng/µl
CCR Puffer	2	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTPs	0,5	10 mM jedes dNTP	0,25 mM jedes dNTP
BSA	2	4 mg/ml	0,4 mg/ml
Oligonukleotid 1	1	20 ng/µl	1 ng/µl
Oligonukleotid 2	1	20 ng/µl	1 ng/µl
Mutagenese Primer	1	20 ng/µl	1 ng/µl
Pfu Polymerase	0,5	2,5 U/µl	0,062 U/µl
Ampligase	0,6	5 U/µl	0,15 U/µl
steriles H ₂ O	zu 20µl	-	-

Das PCR-Programm für die CCR stellte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3.23: PCR-Programm für eine CCR-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	96°C	2 min
2. Denaturierung	30	96°C	30 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	30	56°C	30 sek
4. Synthese (Elongation)	30	72°C	4 min
5. Finale Elongation	1	72°C	7 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Die erhaltenen Fragmente wurden auf ihre Reinheit mittels eines 1%igen (w/v) Agarosegels untersucht, gereinigt, mit den Restriktionsendonukleasen SalI und EagI geschnitten und in den, mit diesen Enzymen, linearisierten Vektor pBCKS (s. Tabelle 3.8) ligiert.

3.2.6.5. Real-time Polymerase Kettenreaktion

Für die quantitative Bestimmung der Bakterienlast in Meerschweinchen wurde Gesamt-DNA aus den infizierten Lungen extrahiert (s. 3.2.3.1) und 50ng in Zweifachbestimmung mittels einer *Legionella*-spezifischen *mip* (*macrophage infectivity potentiator*) Gen-Sonde in der real-time PCR analysiert. Die Sonde trug ein 5'-FAM-Fluorophor (Fluorescein) und einen 3'-TMR (tetramethylrhodamine)-Quencher. Anschließend wurden die Werte auf das Ausgangsvolumen, sprich der Lungenmenge, hochgerechnet und demnach als Bakterienlast pro Lunge angegeben (*mip* Kopienzahl/Lunge). Die PCR und das zugehörige Programm setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3.24: Reaktionsansatz für eine real-time PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	10	variabel	2 ng/ μ l
Platinum Taq Puffer	2,5	10-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTP Mix	2	2,5 mM jedes dNTP	0,2 mM jedes dNTP
MgCl ₂	0,8	50 mM	1,6 mM
Oligonukleotid 1	0,75	10 μ M	0,3 μ M
Oligonukleotid 2	0,75	10 μ M	0,3 μ M
Mip-Sonde	0,25	10 μ M	0,1 μ M
ROX	0,25	10 μ M	0,1 μ M
Platinum Taq	0,1	5 U/ μ l	0,02 U/ μ l
steriles H ₂ O	7,6	-	-

Tablle 3.25: Programm für eine real-time PCR:

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Initiale PCR-Aktivierung	1	95°C	10 min
2. Denaturierung	45	95°C	15 sek
3. Annealing und Elongation	45	60°C	1 min
4. Pause	∞	4°C	∞

3.2.6.6. Reverse Transkriptase –Polymerase Kettenreaktion

Für die Bestimmung der Gen-Expression wurde die Methodik der reversen Transkription angewandt. Hierzu wurde isolierte RNA (s. 3.2.3.4) von DNA-Kontaminationen durch den Einsatz von TurboTM DNase (Ambion) befreit. 2U Enzym pro 1 μ g RNA und 1 μ l RNaseOUTTM wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 μ l für 1h bei 37°C inkubiert, bevor

die DNase durch Temperaturerhöhung auf 75°C für 10min inaktiviert wurde. 1µl des DNase-Restriktionsansatzes wurde in weiterführenden RT-PCR-Experimenten eingesetzt. Einzelsträngige cDNA-Synthese und anschließende Amplifikation des Produktes wurde mit Hilfe des „OneStep RT-PCR“ Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Tabelle 3.26: Reaktionsansatz für eine RT-PCR

Komponente	[µl]	Stocklösung	Finale Konzentration
RNA	1	~ 100 ng/µl	5 ng/µl
OneStep RT-PCR Puffer	4	5-fach konzentriert	1-fach konzentriert
dNTP Mix	0,8	10 mM jedes dNTP	0,4 mM jedes dNTP
RT-PCR Enzym-Mix	0,8	-	-
Oligonukleotid 1	0,3	50 µM	0,75 µM
Oligonukleotid 2	0,3	50 µM	0,75 µM
steriles H ₂ O	12,8	-	-

Das RT-PCR-Profil wurde nach Angaben des Herstellers erstellt, wobei die Annealing-Temperatur der Oligonukleotide an das jeweilige Experiment angepasst wurde. Für die Amplifikation von *plaB* wurden die Primer *plaB_6A-f* und *plaBspir2r* verwendet (s. Tabelle 3.10).

Tabelle 3.27: Programm für eine Einschritt-RT-PCR

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Reverse Transkription	1	50°C	30 min
2. Initiale PCR-Aktivierung	1	95°C	15 min
3. Denaturierung	30-50	95°C	40 sek
4. Primer-Bindung (Annealing)	30-50	54-60°C	40 sek
5. Synthese (Elongation)	30-50	72°C	1 min
6. Finale Elongation	1	72°C	10 min
7. Pause	∞	4°C	∞

Um noch vorhandene DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde bei jedem Experiment ein Ansatz mitgeführt, der nach dem Schritt der reversen Transkription zu den anderen Proben in den Thermocycler gestellt wurde. Nach erfolgter Reaktion wurden die Amplifikate auf einem 2%igen (w/v) Agarosegel analysiert.

3.2.6.7. Sequenzierung-Polymerase Kettenreaktion

Basierend auf der Dideoxy-Methode nach Sanger (236) wurde die DNA-Sequenzierung mit Hilfe von „ABI BigDye Terminator 3.1 Premix“ (s. Tabelle 3.6) und Plasmid-DNA (in H₂O_{bidest} gelöst) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und das PCR-Profil wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 3.28: Reaktionsansatz für eine Sequenzierungs-PCR

Komponente	[μ l]	Stocklösung	Finale Konzentration
DNA	variabel	~ 300 ng/ μ l	30 ng/ μ l
ABI Puffer	1,5	5-fach konzentriert	0,75-fach konzentriert
BigDye 3.1	1	-	-
Oligonukleotid	0,5	10 μ M	0,5 μ M
steriles H ₂ O	zu 10 μ l	-	-

Tabelle 3.29: PCR-Programm für eine Sequenzierungs-Reaktion

Reaktionsschritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	1	96°C	2 min
2. Denaturierung	25	96°C	10 sek
3. Primer-Bindung (Annealing)	25	50-58°C	5 sek
4. Synthese (Elongation)	25	60°C	4 min
6. Pause	∞	4°C	∞

Die elektrophoretische Auftrennung und Fluoreszenzdetektion erfolgte durch Mitarbeiter des Robert Koch-Institutes. Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Lasergene SeqMan Software (s. Tabelle 3.19) durchgeführt.

3.2.7. Herstellung und Transformation von elektrokompenten Zellen

Damit Zellen in der Lage sind, ein DNA-Molekül aufzunehmen, muss deren physiologischer Zustand an die Transformationsbedingungen angepasst werden. Dies kann unter Anwendung der folgenden Methoden geschehen.

3.2.7.1. Herstellung elektrokompenter *E. coli*

E. coli DH5 α und BL21 Stämme (s. Tabelle 3.11) wurden über Nacht auf LB-Agarplatten angezogen und zum Animpfen einer 50ml SOB-Vorkultur verwendet. Diese wurde für ca. 16h unter Schütteln bei 37°C inkubiert, um anschließend 0,5ml der Kultur in 500ml frischen SOB-Mediums zu überführen und sie für weitere 2-3 Stunden bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,8 schütteln zu lassen. Anschließend wurde das gesamte Kulturvolumen in der gekühlten (4°C) Sorvall RC-5 Zentrifuge für 10min bei 5.000 \times g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit je 500ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerol suspendiert und erneut 20min bei 13.000 \times g und 4°C abzentrifugiert. Das nach dem letzten Waschschritt erhaltene Zellpellet wurde in 2ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerol aufgenommen, zügig in 20-80 μ l Aliquots aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

3.2.7.2. Herstellung elektrokompetenter *L. pneumophila*

Zur Erzeugung elektrokompetenter *L. pneumophila* wurde Koloniematerial von einer 2-3 Tage auf BCYE-Agar gewachsenen Kultur mit einer Impföse entnommen und in 1,5ml PBS-Puffer suspendiert und bei $4.500 \times g$ abzentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde zweimal mit 1,5ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 45µl 10%igem (v/v) Glycerol resuspendiert, in 2 Aliquots aufgeteilt und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.2.7.3. Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris*

Elektrokompetente *Pichia*-Zellen wurden nach dem Protokoll von Lin-Cereghino *et al.* (168) hergestellt. Hierzu wurden die Stämme *P. pastoris* GS115 und KM71 in 15ml YPD-Medium (s. Tabelle 3.15) inokuliert und über Nacht bei 30°C und 200rpm im Tischinkubator geschüttelt. Anschließend wurden die Hefezellen in 240ml YPD-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,2 eingestellt, erneut inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,8 geerntet (Sorvall, $1.500 \times g$, 5min, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in 50ml YPD/0,02M HEPES (steril filtriert) resuspendiert und 1,25ml 1M DTT tropfenweise zugegeben. Nach 15min Inkubation bei 30°C und 150rpm, wurden 250ml steriles H₂O zugegeben und die Zellen erneut sedimentiert. Es folgten zwei Waschschrte mit zuerst 250ml und dann 150ml sterilem H₂O_{bidest.} Nach dem letzten Waschschrte wurden die Zellen in 10ml 1M Sorbitol (steril filtriert) resuspendiert, pelletiert und in einem finalen Volumen von 1ml 1M Sorbitol aufgenommen, in 40µl und 80µl Aliquots aufgeteilt und bis zur Elektroporation bei -80°C gelagert.

3.2.7.4. Transformation von DNA

Um DNA als linearisiertes Fragment oder als zirkuläres Plasmid in die Zellen einzubringen und diese damit zu „transformieren“, muss die Zellemembran temporär permeabilisiert werden. Dies geschieht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes im sogenannten Elektroporator und führt zur Porenentstehung und somit erleichterten Aufnahmen von DNA Molekülen.

a) *E. coli*

20µl elektrokompetenter Zellen (s. 3.2.7.1) wurden mit 2µl, in Glycerol resuspendiertem, Ligationsansatz in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette und auf Eis vermischt. Die DNA-Aufnahme erfolgte im eisgekühlten *Cell Porator* bei 330µF, 200 DC Volt und 4kΩ.

Transformierte Zellen wurden in 1ml vorgewärmtem SOC-Medium für 1h bei 37°C geschüttelt und anschließend 100µl der Suspension auf Selektivagar ausgebracht. Die restlichen 900µl wurden für 2min bei $3.200 \times g$ pelletiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im Mediumrücklauf erneut resuspendiert und als Ganzes ausplattiert. Die Platten wurden für 18 - 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und gewachsene Kolonien in anschließender Kolonie-PCR (s. 3.2.6.3) auf die Aufnahme des Plasmides überprüft.

b) L. pneumophila

Die Elektroporation von Legionellen wurde ähnlich zu der von *E. coli* Zellen durchgeführt. 20µl elektrokompetenter *L. pneumophila* wurden mit 20ng des entsprechenden Plasmides vermischt und anschließend im *Cell Porator* bei 330µF, 400 DC Volt und 4kΩ transformiert. Die Inkubation der Zellen in 2ml BYE-Bouillon erfolgte für 4-5h unter ständigem Schütteln bei 37°C. Ausplattiert wurde analog zu der Vorgehensweise von *E. coli*, wobei die Inkubation der Platten für 3-4 Tage bei 37°C vollführt wurde.

c) P. pastoris

Für die Transformation von *P. pastoris* Zellen musste die plasmidale DNA in einem vorausgehenden Schritt linearisiert werden. Hierzu wurden 15µg pJB14 und pJB15 (s. Tabelle 3.9) mit 20U SalI in NEB3-Puffer/BSA in einem Gesamtvolumen von 20µl für 16h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65°C für 20min hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde mit Hilfe des „Wizard SV Gel & PCR cleanup System“ gereinigt und die Konzentration mittels Absorption bei 260nm bestimmt. Für die Transformation wurden 1µg linearisierter DNA mit 40µl elektrokompetenter *P. pastoris* Stämme GS115 oder KM71 (s. Tabelle 3.11) vermischt, auf Eis in einer vorgekühlten Küvette kurz inkubiert und mit den Elektroporator-Einstellungen 1.500 V, 200Ω und 25µF transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 1ml 1M Sorbitol wurden die Hefen für 1,75h bei 30°C und 200rpm inkubiert, 100µl und der Rest auf MD-Selektivagar (s. Tabelle 3.15) ausgebracht und bei 30°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden. Je 8 Kolonien wurden gepickt und erneut über Nacht bei 30°C auf frischen Platten bebrütet. Da sich die Kolonie-PCR für *P. pastoris* als ungeeignet herausstellte, wurde von den „breitgestrichenen“ Kolonien chromosomale DNA isoliert (s. 3.2.3.2) und 1µg DNA mittels PCR und den Primern plaB_Ecof2 und plaB_EagIr auf die Insertion des *plaB* Gens überprüft. Positive Klone wurden als Glyzerolgefrierkulturen konserviert (s. 3.2.1.4).

3.2.8. Transfektion von A549 Zellen

Zur Etablierung der Transfektion von A549 Lungenepithelzellen wurden 2×10^5 A549 Zellen in RPMI + 10% FKS, in 12-*well* Platten ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert, bis sich eine optische Konfluenz von 90-100% eingestellt hatte. Dies entspricht einer realen Konfluenz der Zellen von 30-60% und ist als optimal anzusehen, um bestmögliche Resultate mit dem Transfektionsreagenz METAFECTENE™ zu erzielen. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen 1× mit RPMI gewaschen und 1ml serumfreies Medium zu jedem Well zugegeben. Für die Bestimmung des optimalen Verhältnisses von DNA zu dem Lipid-Transfektionsreagenz wurden diese in unterschiedlichen Mengen miteinander in serumfreien RPMI gemischt. Zuerst wurden Plasmidmengen von 100ng – 2µg in 50µl RPMI gegeben, parallel dazu erfolgte die Zugabe von je 1,5µl oder 3µl METAFECTENE™ pro 500ng DNA in ebenfalls 50µl RPMI. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu der METAFECTENE™-Suspension pipettiert und ohne jeglichen Mischvorgang für 20min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die tropfenweise Zugabe der Lösung zu dem konfluenten Zellrasen. Transfektionsreagenz ohne DNA und der Vektor pEGFP-C2 (zur Überprüfung der Transfektionseffizienz) wurden als interne Kontrollen mitgeführt. Nach 5h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel, wobei serumfreies RPMI abgenommen und durch 1ml RPMI + 10% FKS ersetzt wurde. Nach 24h und 48h erfolgte die Überprüfung der Transfektion mittels Fluoreszenzmikroskopie der Transfektionskontrolle pEGFP-C2, die im Durchschnitt um die 50% bei 500ng transfiziertem Vektor erreichte.

Die Bestimmung freier Fettsäuren erfolgte durch Abnahme des Überstandes und Detektion der Fettsäuren mit Hilfe des „Nefa C“ Kits (Wako), wobei RPMI + 10% FKS als Leerwert mitgeführt wurde. Zur Bestimmung der Protein-Expression mittels Western Blot Analyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber und durch Zugabe von 100µl Proteinladepuffer vom Wellboden gelöst und für 10min bei 99°C lysiert. Anschließende elektrophoretische Auftrennung und Detektion der Antigene (GFP und Flag-Peptid) erfolgte wie in 3.2.10.4 beschrieben.

Die Aktivität von exprimiertem PlaB wurde durch Lipidhydrolyse (s. 3.2.12.3) der Zelllysate bestimmt. Hierzu wurden 200µl A549-Lysepuffer (s. Tabelle 3.5) zu den Zellen (ohne Überstände) gegeben, die Suspension in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und für 20min auf Eis inkubiert. Weitere Zelllyse erfolgte durch Vortexen und mittels einer „26-gauge“ Kanüle durch wiederholtes Auf- und Abziehen der Suspension. Die Inkubation mit entsprechenden Lipidsubstraten wurde in 1:10 und 1:100 Verdünnungen in 40mM Tris pH 7,5

über 18h bei 37°C und 100rpm durchgeführt. Die freigesetzten Fettsäuren wurden wie im unteren Abschnitt beschrieben detektiert (s. 3.2.12.4).

RNA-Extraktion (von ca. 2×10^5 Zellen) und anschließende RT-PCR zur Überprüfung der Transkription transfizierter Templates wurde durch Zugabe von 1ml peqGOLD RNAPure™ und des „OneStep RT-PCR“ Kits nach den Angaben der Hersteller durchgeführt (s. 3.2.3.4 und 3.2.6.6). Zur Amplifikation von *plaB* wurden die Primer PlaB_6A_f und plaB_spir2r, für die der endogenen β -Aktin-Kontrolle die Oligonukleotide β -actin fw und β -actin rv verwendet (s. Tabelle 3.10).

3.2.9. Test auf bakterizide Eigenschaften von PlaB

Für die Testung der bakteriziden Eigenschaften von PlaB wurden *L. pneumophila* Corby Wildtyp und die *plaB* Mutante plaB1 für 2 Tage bei 37°C und auf BCYE-Festagar kultiviert. Die auf Inhibition durch Legionellen zu untersuchenden Bakterienstämme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* und *S. aureus* (s. Tabelle 3.11) wurden für 1 Tag auf LB-Agarplatten inkubiert. Anschließend wurden die Legionellen auf eine Zellzahl von $1 \times 10^7/100\mu\text{l}$, alle anderen Bakterienstämme auf $1 \times 10^5/100\mu\text{l}$ in PBS-Puffer eingestellt und im Verhältnis 1:1 (je 100 μl) vermischt und für 5min bei $16.000 \times g$ sedimentiert. Die Suspension wurde für 20h bei 37°C inkubiert und nach erneutem Mischen 1:10 (entspricht Wert 0, s. Ergebnisse 4.3.3) und im Weiteren bis 10^{-4} in PBS-Puffer verdünnt. Je 10 μl der Verdünnungen wurden auf LB-Agarplatten getropft, um das Legionellenwachstum zu unterdrücken. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und das Wachstum der Konkurrentenstämme anschließend mit einer digitalen Spiegelreflexkamera EOS 450D dokumentiert.

3.2.10. Proteinanalytik

3.2.10.1. Fällung von Proteinen mittels TCA-EtOH

Zur Entfernung denaturierender Agenzien, wie z. B. Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl), oder zur Konzentrierung des Proteingehalts einer Probe wurde die Trichloressigsäure-Ethanol-Präzipitation nach Lebediker (<http://wolfson.huji.ac.il/purification/>) angewandt. Hierzu wurden 10 μl Probe mit 90 μl H₂O vermischt und durch die Zugabe von 100 μl einer 20%igen (w/v) TCA-Lösung für 20min auf Eis inkubiert. Nach erfolgter Pelletierung für 15min, $16.000 \times g$ bei 4°C, wurde das Pellet 2 \times mit 100 μl reinem eiskalten EtOH gewaschen und das Pellet anschließend in SDS-Proteinauftragepuffer resuspendiert und auf ein Polyakrylamidgel aufgetragen.

3.2.10.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Bradford-Methode und nach den Angaben des Herstellers der Färbelösung „*Roti Nanoquant*“ (s. Tabelle 3.3).

3.2.10.3. Eindimensionale (1D) - SDS-PAGE

Um die größenabhängige Auftrennung von Proteinen zu erreichen, wurden 10 oder 12,5%ige SDS-Tris-Polyakrylamidgele nach der Methode von Laemmli (158) verwendet (s. Tabelle 3.5). Die Proben wurden mit je 5µl reduzierendem Protein-Probenpuffer versetzt, 90s bei 99°C denaturiert und in SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 3.5) bei konstanten 40mA und bei Raumtemperatur (RT) aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine im Gel wurden die zwei folgenden Färbemethoden angewandt:

a) Coomassie-Färbung von Proteinen

Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in kolloidal Coomassie-Färbelösung nach dem Rezept des Herstellers und unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes wurde durch anschließende Inkubation in H₂O_{bidest} vollführt und das Gel nach 30min in Fixierlösung (s. Tabelle 3.5) zwischen zwei Cellophanfolien getrocknet und so konserviert.

b) Silberfärbung von Proteinen

Zur Erhöhung der Detektionsgrenze bei geringem Proteinanteil wurde die Nachweismethode der Silberfärbung entweder mit Hilfe des „*Silver Staining Kit*“ nach den Vorgaben des Herstellers (Amersham) oder nach Gharahdaghi *et al.* (107) und eigens hergestellten Lösungen angewandt (s. Tabelle 3.5). Die Reaktionszeiten des eigenen Protokolls richteten sich nach denen des kommerziell erworbenen Systems von Amersham.

3.2.10.4. Western Blot und Immundetektion

Bei der Methodik des Western Blots werden Proteine, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden (s. 3.2.10.3), auf eine Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (s. Tabelle 3.6). Nach erfolgter Elektrophorese wurden das Gel und die PVDF-Membran, die bereits mit 100%igem Methanol aktiviert wurde, für 10min bei RT in Transferpuffer (s. Tabelle 3.5) geschüttelt. Der Proteintransfer wurde anschließend nach Anleitung des Herstellers des verwendeten Semidry-Elektroblotter (Pharmacia) durchgeführt. Hierzu wurden 4, in Transferpuffer getränkte, Whatman Papierstücke anodenseitig in den

Blotter gelegt, darauf die äquiliibrierte PVDF Membran, dann das SDS-PAGE Gel und abschließend weitere 4 Lagen Whatman Papier. Nach Auflegen der Kathode wurden Proteine mit $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ Gel für 1h bei RT auf die Membran übertragen. Nach Beendigung des Proteintransfers wurde die Membran entweder für 1h bei RT oder über Nacht bei 4°C in PBS mit 5% Milchpulver inkubiert. Nach Absättigung der freien Bindungsstellen und kurzem Schwenken der Membran in PBS-Puffer erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers (s. Tabelle 3.6) für 1h bei RT. Anschließend wurden drei 10-minütige Waschschrte in PBS-T Lösung vorgenommen, gefolgt von der Inkubation der Sekundäantikörperlösung, welche Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Anti-Maus-IgG Antikörper enthielt (1h unter leichtem Schwenken). Nach drei abschließenden Waschschrten mit PBS-T für je 10min erfolgte die Detektion des Zielproteins mit dem „*ECL Plus Western Blotting Detection Reagent*“ (Amersham). Da die Peroxidase die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert und die dabei auftretende Chemilumineszenz mittels einer hochauflösenden CCD-Kamera aufgenommen werden kann, wurde zur Detektion ein Chemilumineszenz-Imager der Firma Vilber Lourmat verwendet. Alternativ zu dieser Detektionsmethode wurde ein kolorimetrischer Nachweis der Proteine mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als HRP-Substrat durchgeführt. Hierbei wurde die Membran in 15ml PBS mit einer Spatelspitze DAB und unter Zugabe von 0,024% H_2O_2 inkubiert, bis die gesuchten Banden sichtbar wurden.

3.2.11. Expression und Reinigung von Proteinen

Proteine können, nach erfolgter Expression, ihren biochemischen Eigenschaften nach über verschiedene chromatographische Verfahren zur Reinheit gebracht werden. Folgende Expressionssysteme und Reinigungsmethoden wurden nach Angaben der Hersteller oder nach eigenem Protokoll durchgeführt.

3.2.11.1. Proteinexpression in *E. coli*

Wie bereits in 3.2.1.2 beschrieben, wurden 500ml *E. coli*-Kulturen der beginnenden exponentiellen Phase (OD_{660} 0,6 – 0,8) mit einer Endkonzentration von 1mM IPTG zur Proteinproduktion induziert. Nach 4h Inkubation wurden die Zellen bei $10.000 \times g$ für 10 – 20min bei 4°C pelletiert und bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss und die anschließende Proteinreinigung sind in 3.2.11.4 beschrieben.

3.2.11.2. Proteinexpression in *P. pastoris*

P. pastoris *plaB*-Positive sowie die Kontrollstämme GS115 und KM71 wurden über Nacht in 10ml BMGY-Flüssigmedium angezogen. Anschließend wurde gerade soviel Zellmaterial abgenommen und abzentrifugiert, dass nach dem Suspendieren in 20ml BMMY eine OD₆₆₀ von 0,8 – 0,9 erreicht werden konnte. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5% alle 24h. Alle Inkubationsschritte wurden bei 30°C im Tischinkubator unter 250rpm ständigem Schütteln durchgeführt. Die Probenentnahme von je 1ml (5min, 5000 × g, 4°C) und die Messung der optischen Dichte bei 660nm erfolgte nach 0', 5,5', 19', 25', 48', 72' und 96 Stunden. Insgesamt wurden je 2 Klone für die intrazelluläre Expression beider Stämme (s. Tabelle 3.12) und 2 Klone für die sekretierte Version der Stämme KM71 und GS115 auf die Expression von *plaB* überprüft. Dies erfolgte durch Elektrophorese von 20µl Kulturüberstand oder durch auf eine OD von 1 eingestellte Zellpellets in einem 10%igen Polyakrylamidgel und anschließender Silber- oder Coomassiefärbung (s. 3.2.10.3). Weiterhin wurden die Überstände der *PlaB*-sekretierenden Stämme auf Enzymaktivität mittels Lipidhydrolyse (s. 3.2.12.3) untersucht.

3.2.11.3. *In vitro* Translation

Mit der Methode der *in vitro* Translation lassen sich schwer zu reinigende Proteine, z. B. Enzyme, die in „*inclusion bodies*“ aggregieren, in einem zellfreien System transkribieren und translatieren. In dieser Arbeit wurden zwei Expressionssysteme verwendet, ein „*T7 Sample System*“ mit Extrakten aus *E. coli*, Kaninchen-Retikulozyten und Weizenkeimlingen der Firma Promega, und das „*PURExpressTM in vitro Protein Synthesis Kit*“, erworben von NEB. Letzteres beruht auf einem hochreinen System rekombinant hergestellter Enzyme des Syntheseapparates, die gleichzeitig als His-Fusionsproteine vorliegen und so durch inverse Affinitätschromatographie aus dem Translationsansatz entfernt werden können. Zudem ist durch die kontrollierten Bedingungen der Abbau des Zielgens bzw. Proteins, vermittelt durch Nukleasen und Proteinasen eines rohen Zellextraktes, vermindert.

Die Durchführung richtete sich ganz nach den Angaben der Hersteller, wobei die eingesetzte Plasmidmengen 1µg bei den Ansätzen des „*T7 Sample System*“ und 250ng bei denen des „*PURExpressTM in vitro Protein Synthesis Kit*“ entsprachen. Da sich das „*T7 Sample System*“ aus vier verschiedenen Extrakten zusammensetzt, von denen 2 bevorzugt mit linearer DNA arbeiten, wurde der eingesetzte Vektor pJB03 für diese Ansätze vorher mit *ZraI* linearisiert und anschließend mit Hilfe des „*Wizard SV Gel & PCR cleanup System*“ gereinigt.

3.2.11.4. Reinigung mittels Ionentausch- und Affinitätschromatographie

Nach erfolgter Expression in *E. coli* BL21 (s. 3.2.11.1) wurde das Zellpellet in den zugehörigen Puffern resuspendiert und aufgeschlossen:

a) Anionentauschchromatographie

Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet einer BL21 (pJB01) Kultur in 1/10 des ursprünglichen Kulturvolumens in Resuspensionspuffer (s. Tabelle 3.5) aufgenommen und nach Zugabe von 1× Proteaseinhibitormix 4× 30sek mit Ultraschall und einer Amplitude von 65% auf Eis lysiert. Die Abtrennung der unlöslichen Fraktion erfolgte durch Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für 20min. Der Überstand nach Zellyse wurde anschließend mittels Lipidhydrolyse (s. 3.2.12.3) auf Aktivität von PlaB hin überprüft. Darauf folgend wurde 1/5 des Überstandsvolumens 1:10 mit dem Proteinbindepuffer der Anionentauschchromatographie vermischt und auf die ebenfalls mit Proteinbindepuffer äquilibrierte 1ml HiTrapTM Q FF Säule (Amersham) geladen. Die Beladung und Reinigung wurde an dem FPLC-System ÄktaPrime mit einer Flussrate von 1ml/min durchgeführt. Nachdem die ersten 4 Fraktionen mit 10ml fraktioniert wurden, wurde durch Anlegen des Elutionsgradienten, ein Stufengradient mit jeweils um 10% steigender NaCl-Konzentration (0-100%), mit 2ml fraktioniert. Im Chromatogramm als relevant erscheinende Fraktionen (bezüglich des Proteingehalts) wurden mittels Lipidhydrolyse auf lipolytische Aktivität untersucht. Anschließend wurde die Proteinmenge bestimmt (s. 3.2.10.2) und mit Hilfe der SDS-PAGE auf den Reinheitsgrad des PlaB-Enzyms untersucht.

b) GST-Affinitätschromatographie

Das Zellpellet einer BL21 (pJB18) Kultur wurde in 1/20 des Kulturvolumens mit PBS-Puffer resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym, 1mM EDTA und 1× Proteaseinhibitormix für 30min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die vollständige Zellyse wurde durch dreimaliges Schallen der Suspension mit einer Ultraschallsonde für 30sek und einer Amplitude von 65% herbeigeführt. Anschließend wurde die Lösung für 30min bei $9.000 \times g$ und 4°C sedimentiert und der Überstand vor Beladung der Glutathion-Sepharose mit 100U Benzonase von DNA-Kontaminationen befreit und steril filtriert. Die Reinigungsschritte wurden nach Angaben des Herstellers des „Bulk and RediPack GST Purification Modules“ durchgeführt. Das Ausgangsvolumen der Glutathion-Sepharose 4B Suspension wurde auf 500µl festgelegt und entsprechend frisch aus der mitgelieferten Originalsuspension der Sepharose hergestellt. Nach erfolgter Bindung wurden die Beads dreimal mit 1/200 des

Kulturvolumens mit PBS gewaschen und die Proteine anschließend in drei Elutionsschritten mit je 1/2000 an Glutathion-Elutionspuffer für 1min bei RT inkubiert und damit von der Sepharose eluiert. Alle zwischenzeitlichen Zentrifugationsschritte erfolgten für 5min bei $500 \times g$ und RT. Um zu überprüfen, ob nach der Elution noch Proteinreste an den Kügelchen gebunden waren, wurden diese erneut in 1/2500 des Kulturvolumens in PBS resuspendiert, davon 1/6 abgenommen, bei $16.000 \times g$ für 1min sedimentiert, die Kügelchen in 15µl Proteinauftragepuffer aufgenommen und der Überstand nach 90sek bei 99°C ebenfalls auf das Polyakrylamidgel aufgetragen.

3.2.11.5. Reinigung und Solubilisierung von „*inclusion bodies*“

Zur Reinigung von Einschlusskörperchen, den sogenannten „*inclusion bodies*“ (IB) wurde das Zellpellet einer 500ml Kultur BL21 (pJB01) mit 5ml/g_{Nassgewicht} der Zellen an „*BugBuster Extraction Reagent*“, 2.5 Kilounits/g Lysozym, 15µl Benzonase (375U) und 15µl 1× Proteaseinhibitor für 20min bei RT auf einem Drehrad inkubiert. Die Pelletierung erfolgte anschließend bei $15.000 \times g$ und 4°C für 20min. Für weiterführende Rückfaltungsexperimente wurde das Pellet 2× mit 1/33 des Kulturvolumens an IB-Waschpuffer (s. Tabelle 3.5) und nach dem empfohlenen Protokoll des „*Pro-MatrixTM Protein Refolding Guide*“ (Pierce) behandelt. Anschließend wurden die „*inclusion bodies*“ 2× in 1/33 an IB-Resuspensionspuffer aufgenommen, 15min bei $15.000 \times g$ und 4°C sedimentiert und das Nassgewicht der IBs bestimmt. Da die Reinheit der Einschlusskörperchen noch ungenügend war, wurden zusätzliche Reinigungsschritte unternommen. Das IB-Pellet wurde erneut mit 1/100 des Kulturvolumens an BugBuster, einer Spatelspitze an Lysozym, 50U Benzonase und 5µl 1× Proteaseinhibitor behandelt, gewaschen und resuspendiert, wie bereits angegeben. Eine Abtrennung weiterer Proteine wurde durch Inkubation des Pellets in 50mM Tris pH 8,0, 10mM EDTA und 4M Urea erreicht. Die so erhaltenen „*inclusion bodies*“ wurden mit 1ml IB-Solubilisierungspuffer/20mg Nassgewicht (s. Tabelle 3.5) für 50h bei 4°C inkubiert und die verbleibenden unlöslichen Bestandteile für 20min bei $20.000 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. 1/500 der solubilisierten Lösung wurde mittels TCA-Ethanol-fällung (s. 3.2.10.1) von GuHCl befreit und auf den Solubilisierungsgrad mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft.

3.2.11.6. Rückfaltung von PlaB

Die in Abschnitt 3.2.11.5 gewonnenen und solubilisierten „*inclusion bodies*“ wurden mittels Roti Nanoquant auf ihren Proteingehalt untersucht (s. 3.2.10.2). Nachfolgende Rückfaltungsansätze wurden nach den Angaben des „*Pro-MatrixTM Protein Refolding Guide*“ (Pierce)

zusammengesetzt. Dieser basiert auf einer Rückfaltung durch Verdünnung der denaturierten Proteine (1:20) in entsprechenden Puffersystemen mit die Faltung beeinflussenden Additiven. Die als Grundlage verwendeten Rückfaltungspuffer kombinieren hier die zwei Denaturierungsagenzien L-Arginin und Guanidin in verschiedenen Molaritäten, da diese in geringen Konzentration die Aggregation von Proteinen unterdrücken, die native Form der Enzyme aber nicht beeinflussen sollen. EDTA wurde ebenfalls in allen Reaktionen zur Stabilisierung des Redoxzustandes in einer Konzentration von 1mM mitgeführt. Die durchschnittliche Rückfaltungszeit wurde auf 24h festgelegt. Weiterhin wurde die Proteinkonzentration im Rückfaltungsansatz variiert, da diese eine entscheidende Rolle im Aggregationsprozess (viel Protein → leichtere Aggregation) spielt. Es wurden Ansätze mit 25µg/ml und 100µg/ml an Proteinendkonzentration untersucht. Da die Temperatur einen enormen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Faltung nehmen kann, wurden die Rückfaltungsansätze bei verschiedenen Temperaturen von 4°C, 20°C und 30°C inkubiert. Weiterhin war nicht bekannt, welchen Disulfidstatus das PlaB-Enzym besitzt, daher wurden Rückfaltungsexperimente in unterschiedlichen Redoxumgebungen zur eventuellen Bildung von Disulfidbrücken angesetzt, aber auch der Zustand unter ständiger Reduktion des Systems durch Zugabe von 5mM DTT untersucht. Polyethylenglycol (PEG) kann die Aggregation durch Bindung an die hydrophoben Bereiche der Faltungsintermediate verhindern, daher wurde das Agens im molaren Verhältnis von 2:1 und 4:1 zu PlaB in Puffern mit geringen Denaturierungsmittelkonzentrationen eingesetzt. Letztendlich wurde der Einfluss der divalenten Kationen $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ zu je 2mM (ohne EDTA-Zusatz) und der eines natürlichen Substrates von PlaB (MPLPC in einer Endkonzentration von 3mM + 0,2% Triton X-100) untersucht.

3.2.12. Nachweis von Phospholipaseaktivität

3.2.12.1. Gewinnung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen

Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte (meist $\text{OD}_{660}=2$) in den angezogenen Flüssigkulturen wurde 1ml Kulturvolumen entnommen und bei $5.000 \times g$ für 5min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände von den Zellpellets getrennt. Die Kulturüberstände wurden mit einer finalen Konzentration von 3mM mit Natriumazid versetzt und bei 4°C gelagert. Die Zellpellets wurden bis zur Verwendung bei -20°C weggefroren. Die Zelllyse wurde durch Zugabe von 0,1 % Triton X-100 und 50µl Lysozym (10mg/ml) für 30min bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die lysierten Zellpellets mit einer „26-gauge“ Kanüle homogenisiert und mit 40mM Tris-HCl pH 7,5 auf das Ausgangsvolumen (1ml) aufgefüllt.

3.2.12.2. Gewinnung von U937 Zelllysaten und Überständen

1×10^6 ausdifferenzierte U937 Makrophagen wurden analog zu der in Abschnitt 3.2.14.2 beschriebenen Vorgehensweise mit einer MOI=1 infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellüberstände abgenommen und mit einem $0,2\mu\text{m}$ Filter steril filtriert. Die Zellen wurden in Anwesenheit von $200\mu\text{l}$ 40mM Tris pH 7,5 entweder durch wiederholtes Auf-und Abziehen durch eine Pipettenspitze oder durch Abschaben der Zellen mit einem, durch reinen EtOH desinfizierten, Metallspatel vom Wellboden abgelöst. Je $100\mu\text{l}$ wurden in 2 neue Reaktionsgefäße überführt, von denen ein Teil der Zellen bis zur RNA-Extraktion bei -20°C gelagert wurde, der andere durch 10-minütige Inkubation in einem Ultraschallbad lysiert und bis zur Bestimmung der phospholipolytischen Aktivität ebenfalls bei -20°C weggefroren wurde. Für den Verdau von Lipidsubstraten wurde das Zelllysate durch Zugabe von 40mM Tris-Puffer (s. Tabelle 3.5) wieder auf das Ausgangsvolumen der Infektion gebracht und unverdünnt in das Hydrolyseexperiment (3h Inkubation) eingesetzt.

3.2.12.3. Verdau von Lipidsubstraten

Zur Untersuchung der lipolytischen Aktivität wurden verschiedene Substrate (s. Tabelle 3.4) mit *L. pneumophila* Zelllysaten und Kulturüberständen als auch Zelllysaten der U937 Infektion oder Überstände der *plaB*-Expression in *P. pastoris* inkubiert. Gleichermäßen wurden auch *E. coli* Zelllysate oder Fraktionen der Proteinreinigung behandelt. Hierzu wurden die Lipide mit einer Endkonzentration von 13,4 mM und unter Zusatz von 6mM NaN_3 , 1% Triton X-100 und 40mM Tris-HCl (pH 7,5, 25°C) angesetzt. Die Substrate wurden für 10min bei RT und anschließend für 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zur Förderung der Mizellen-Bildung erfolgte eine Ultraschallbehandlung von jeweils drei 15sek andauernden Intervallen bei einer Intensität von 65 %. Danach wurden die Substrate in einem Verhältnis 1:1 mit den zu analysierenden Proben versetzt (je $25\mu\text{l}$) und variable Zeitspannen in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte bei 37°C und 150 rpm oder 100rpm über Nacht inkubiert. Dabei richteten sich die Inkubationsdauer und die jeweiligen Verdünnungen nach den spezifischen experimentellen Bedingungen. Als Beispiel sei hier die Inkubationszeit und die Verdünnung von *plaB*-exprimierenden Vektoren (z. B. pJB04) in der *L. pneumophila plaB* Mutante vermerkt: Die 1:100 Verdünnung eines Zelllysates erreichte ihr Detektionsmaximum für DPPG-Hydrolyse unter Standardbedingung nach 30-45min Inkubationszeit bei 37°C .

Die Negativkontrollen der Kulturüberstände, BYE-Bouillon für *L. pneumophila* bzw. LB-Bouillon für *E. coli*, und 40mM Tris-Puffer für die Zellpelletlysate wurden stets mitgeführt und als Basiswert bei anschließenden Kalkulationen vom Probenwert subtrahiert. Bei

Messungen der Phospholipaseaktivität von U937 Infektionsüberständen diente RPMI + 10% FKS als Hydrolysekontrolle. Im Anschluss an die Inkubation der Lipid-Proben-Suspension erfolgte die Bestimmung der Menge freigesetzter Fettsäuren.

3.2.12.4. Bestimmung der Menge an freien Fettsäuren

Die durch lipolytische Enzymaktivitäten freigesetzten Fettsäuren konnten mit Hilfe des „Nefa C“ Kits der Firma Wako Chemicals nachgewiesen werden. Dies wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch den im Kit enthaltenen Oleinsäurestandard wurde die Konzentration der freien Fettsäuren anhand einer Standardkurve mit Hilfe der folgenden Standardkonzentrationen 0/ 0,2/ 0,4/ 0,6/ 0,8 und 1,0 mM freie Fettsäuren, bestimmt.

3.2.12.5. Lipidextraktion und Dünnschichtchromatographie

Die Extraktion verschiedener Lipidspezies, z. B. aus der Zellmembran von Bakterien oder aus dem Lungengewebe von Meerschweinchen, erfolgte nach der Methode von Bligh und Dyer (29). Hierzu wurde eine 100µl-Probe mit 400µl Methanol und 200µl Chloroform für 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 280µl H₂O_{bidest} sowie 200µl Chloroform zugegeben und für eine gründliche Durchmischung der Phasen 10min bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert. Danach wurde zur Phasentrennung 2min bei $2.000 \times g$ zentrifugiert und die Chloroformphase (Lipidphase) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1/3 unter Vakuum evaporiert. Der restliche extrahierte Ansatz und die lyophilisierten Lipide wurden bei -20°C gelagert. Die getrockneten Lipide wurden vor der Dünnschichtchromatographie in 25µl Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen und je 10µl auf Kieselgelplatten aufgetragen. Zur Detektion der polaren Lipide aus bakteriellen Zellmembranen wurde die beladene Kieselgelplatte in einen Glastank gestellt und mit einem polaren Laufmittel, bestehend aus n-Propanol:Propionsäure:Chloroform und H₂O (30:20:20:10 (v/v/v/v), (67)) für 6h verschlossen inkubiert.

Bei der Verarbeitung von 50µl Lungengewebe aus Meerschweinchen wurden 2 zusätzliche Chloroformwaschschritte (mit je 100µl) vor der Evaporation eingefügt, um etwaige Reste vorhandener Lipide zu extrahieren. Die Chloroformphasen wurden vereinigt, je 50µl davon evaporiert, vollständig auf Kieselgelplatten aufgetragen und mittels 3 unterschiedlicher Laufmittel im Glastank entwickelt. Für polare Substanzen wurde ein Laufmittel, bestehend aus einem Chloroform:Methanol:Wasser-Gemisch [65:25:4 (v/v/v)], verwendet. Die Trennung apolarer Lipide erfolgte mittels einer Lösung an n-Hexan:Diethylether und Essigsäure [70:30:4 (v/v/v)], wohingegen die von Cholesterol und seiner veresterten Form mit Hilfe von Petrolether:Diethylether und Essigsäure [90:10:1 (v/v/v)] durchgeführt wurde. Zur

Detektion der Lipide wurden die Kieselgelplatten kurz in Wasser gewaschen, anschließend für 10min mit 0,2% Naphtol Blauschwarz in 1M NaCl inkubiert und schließlich mit 1M NaCl gespült, bis die Lipidspots klar erkennbar waren (206). Als Lipidreferenzen wurden je 2µl entsprechender Lipidlösungen (10mg/ml) mit auf die Kieselgelplatten aufgetragen.

3.2.12.6. Hämolyseassay

In Anlehnung an Kirby und Mitarbeiter (150) wurden 37,5µl humane Erythrozyten in 10ml PBS für 5min bei $10.000 \times g$ sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal in je 10ml PBS gewaschen und letztendlich in 10ml PBS-Puffer resuspendiert. Zu untersuchende Bakterien wurden für 1 Tag auf Platte (entweder BCYE- oder LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikas) kultiviert und in PBS-Puffer auf eine OD_{660} von 0,3 eingestellt. Anschließend wurden 400µl der Blutzellsuspension mit 400µl der Bakterienlösung vermischt, 2min bei $16.000 \times g$ pelletiert und bis zur Vermessung bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei den angegebenen Zeitpunkten (s. Ergebnisse) wurde die Suspension für 5sek stark geschüttelt (Vortexer), erneut abzentrifugiert und je 100µl in einer Mikrotiterplatte und bei einer Wellenlänge von 415nm (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) vermessen. Als Lysekontrolle wurden anstelle der Bakterien 400µl Ethanol (100%) eingesetzt, als Negativkontrolle diente PBS-Puffer.

3.2.13. Extraktion von Lipopolysaccharid (LPS)

Zur Extraktion von LPS aus *L. pneumophila* wurde die Hälfte an Bakterienkultur einer dicht bewachsenen BCYE α -Agarplatte, die für 2 Tage bei 37°C bebrütet worden war, abgenommen und in 3ml PBS resuspendiert und zum Abtöten der Keime autoklaviert. Anschließend wurde die Suspension für 5min stark geschüttelt (Vortexer Mixer) und 25min bei 2500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 12ml unvergälltem EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Erfolgte Präzipitate wurden für 15min bei 2500 rpm (4°C) sedimentiert und das entstandene Pellet für 2-3h bei RT getrocknet. Um DNA-Spuren zu entfernen, wurde das Pellet in 500µl PBS Puffer suspendiert und mit 25U Benzonase für 24h behandelt. An dieser Stelle wurde das Protokoll für eine Lagerungseinheit bei -20°C unterbrochen. Extrahiertes LPS wurde weiterhin durch Inkubation mit 100µg Proteinase K bei 56°C für 2h von Proteinkontaminationen befreit und anschließend durch Zugabe der gleichen Volumeneinheit (500µl) an 2× Proteinladepuffer für 30min bei 65°C erhitzt. Die so erhaltenen Proben wurden im Vergleich der Stämme Corby Wildtyp und der *plaB* Mutante *plaB1* auf einem 12,5%igen SDS-Polyakrylamidgel mittels Silberfärbung untersucht.

3.2.14. Koinfektion von *A. castellanii* Amöben, A549 Lungenepithelzellen und U937 Makrophagen mit *L. pneumophila* Corby

3.2.14.1. Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in *A. castellanii*

A. castellanii Amöben wurden für 3 Tage in PYG-Medium bei 37°C + 5% CO₂ kultiviert, anschließend durch Klopfen von der Kulturflasche gelöst und die Zellzahl in einer Neubauer Zählkammer durch Gegenfärbung mit Trypanblau bestimmt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml in Infektionsmedium resuspendiert und je 1ml in die entsprechenden 24-well Reaktionsplatten gegeben.

Die 2 Tage bei 37°C auf BCYE α -Agar inkubierten *L. pneumophila* wurden mit einer sterilen Impföse in PBS überführt und auf eine OD₆₆₀ von 0,3 ($1-5 \times 10^8$ Zellen je ml) eingestellt. Die Suspension wurde anschließend 10^5 -fach mit Infektionsmedium verdünnt und so auf eine Zellzahl von 1×10^3 Bakterien/ml gebracht. Das Verhältnis von Bakterien zu Amöben wird als MOI (*multiplicity of infection*) bezeichnet und entspricht in diesem Ansatz einem Wert von 0,01. Pro Zeitpunkt wurden zwei bzw. drei Parallelwerte koinfiziert. Die Probenentnahme erfolgte nach 0, 24, 48 und 72 Stunden, wobei 100µl abgenommen, der Inkubationszeit entsprechend verdünnt und 50µl zur Ermittlung der Bakterienzahl auf BCYE α -Agarplatten in logarithmisch abnehmender Menge ausplattiert wurden. Dies erfolgte unter Verwendung des „Whitley Spiral Plater“ der Firma Meintrup DWS. Anhand der Zählung der koloniebildenden Einheiten CFU (*colony forming units*) auf Platte mit Hilfe des Acolyte-Koloniezählgerätes konnte die Entwicklung der Zellzahl jedes getesteten Klons rekonstruiert werden. Dieses ist als Maßstab für die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen anzusehen.

3.2.14.2. Infektion von U937 Makrophagenzellen

Neben der Gewinnung von Zelllysaten zur Überprüfung der phospholipolytischen Aktivität (s. 3.2.12.2) wurde auch die Vermehrung der Stämme in U937 Makrophagenzellen dokumentiert. Hierzu wurden die passagierten Monozyten (s. 3.2.2) 1 Tag vor der Infektion durch Zugabe von 50ng/ml Phorbol-Ester (Phorbol-12-Myristat-13-Azetat, PMA) zu phagozytierenden Makrophagen ausdifferenziert. Der nun adhärente Zellrasen konnte durch die Inkubation in 10ml 0,2% EDTA in $1 \times$ PBS für 5min bei 37°C und durch zusätzliches Klopfen vom Kulturschalenboden gelöst werden. Nach der Überführung in ein Plastikröhrchen wurde die Flasche mit RPMI-Medium ohne FKS-Zusatz gespült und das Zellvolumen auf 50ml aufgefüllt. Die Zellen wurden dann durch 2 Zentrifugationsschritte bei 800rpm für 10min in der Labofuge400 gewaschen. Nach erfolgter Zellzählung in einer

Neubauer-Kammer wurden die Zellen mit einer Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in die jeweiligen Wells gegeben und zur erneuten Zelladhäsion für 2h bei 37°C/ 5% CO₂ inkubiert. Für die U937 Infektion wurden die Legionellen ähnlich vorbereitet, wie es bereits beschrieben wurde (s. 3.2.14.1). Von der verdünnten Legionellen-Suspension ($\sim 2 \times 10^6$ /ml) wurden 0,5 ml entnommen und zu den adhären U937 Zellen gegeben (MOI=1). Nach gemeinsamer Inkubation (2h/ 37°C/ 5 % CO₂) wurden die Legionellen, die bis dahin nicht in die Wirtszellen eingedrungen oder an diese adhärirt waren, durch dreimaliges Waschen mit RPMI ohne FKS-Zusatz abgespült. Anschließend wurde 1ml RPMI mit 10% FKS zugegeben und die Infektion bis zu 96h inkubiert. Um zu überprüfen, wie sich die Bakterien intrazellulär vermehren, wurde die Koinfektion bei den angegebenen Zeitpunkten mit 10µl Saponin [Stocklösung: 10% (w/v) in PBS] versetzt und 5min bei 37°C/ 5%CO₂ inkubiert. Dies führte zur Lyse der U937 Zellen und zur Freisetzung der Bakterien. Ein entsprechend verdünntes Aliquot konnte dann, wie bereits in 3.2.14.1 beschriebener Vorgehensweise, auf BCYE α -Agar ausplattiert werden.

3.2.14.3. Infektion von A549 Lungenepithelzellen zur Bestimmung der Zytokinsekretion

Für die Bestimmung der Zytokinsekretion nach Legionelleninfektion von A549 Lungenkarzinom-Epithelzellen wurden die passagierten Zellen (s. 3.2.2) 1× mit PBS-Puffer gespült und anschließend durch das Einwirken von 1× Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Zellen wurden 2× mit RPMI ohne FKS-Zusatz bei 800rpm für 5min gewaschen, deren Zahl auf 1×10^5 Zellen/ml in Vollmedium (RPMI mit 10% FKS) eingestellt und je 1ml in die Löcher einer 24-Well-Platte gegeben. Nach 24h Inkubation wurden das Medium vom konfluenten Zellrasen entfernt und den Zellen durch Zugabe von 1ml RPMI ohne Zusätze wichtige Wachstumsfaktoren entzogen, damit sie besonders suszeptibel für die nachfolgende Infektion waren. Nach weiteren 20h Inkubation erfolgte die Infektion der A549 Zellen mit Legionellen mit einer MOI zwischen 10-100 (Vorgehensweise s. 3.2.14.1). Die Bakterien wurden für 15min bei 800rpm auf die Zellen zentrifugiert und für die angegebenen Zeiträume, 30min bis 23h, bei 37°C / 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Koinkubation erneut bei $200 \times g$ für 10min sedimentiert, der Infektionsüberstand für die Messung der Zytokinsekretion abgenommen und mittels ELISA quantifiziert oder bei -20°C für weitere Experimente gelagert.

3.2.15. Infektion von Meerschweinchenlungen

Männliche Meerschweinchen des Stammes Hartley (s. Tabelle 3.11), mit einem Gewicht von ca. 300g, wurden bis zur Infektionsoperation im Tierstall unter Quarantänebedingungen gehalten. Je drei Tiere wurden intratracheal mit einer Bakterienlast von $1-3 \times 10^6$ Legionellen der Stämme *L. pneumophila* Corby Wildtyp (pBCKS), der *plaB* Mutante *plaB1* (pBCKS) und der Komplementante *plaB1* (pJB04) infiziert. Die Bakterien wurden zuvor in BYE-Bouillon bis zur exponentiellen Phase kultiviert und auf die entsprechende Zellzahl in PBS-Puffer eingestellt. Ein zehntes Tier erhielt PBS ohne Bakterien und wurde fortan als Saline-Kontrolltier bezeichnet. Zur Bestimmung der Bakterienlast nach Infektion wurden die Meerschweinchen nach 48h mittels Kohlenstoffdioxid euthanasiert, die Lunge und die Milz entnommen, die Organe gewogen und in entsprechenden Mengen (100µl/100mg) an PBS-Puffer aufgenommen und homogenisiert (Homogenisator Ultra-Turrax T25). Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen auf BCYE-Agarplatten ausplattiert, um die koloniebildenden Einheiten (CFU) zu zählen. Um zu überprüfen, ob die Legionellen die enthaltenen Plasmide verloren hatten, wurden einige Klone von den Platten gepickt und auf BCYE und BCYE/Cm-Agarplatten im Vergleich ausgestrichen und das Wachstum dokumentiert (s. Dissertation Schunder).

3.2.16. Bestimmung der Zytokinsekretion von infizierten A549 Zellen

Für die Detektion und Quantifizierung der Zytokinsekretion von mit Legionellen infizierten A549 Lungenepithelzellen wurden Infektionsüberstände gewonnen (s. 3.2.14.3) und mit Hilfe der folgenden Verfahren auf das Vorhandensein von verschiedenen Immunstimulatoren untersucht.

3.2.16.1. Screening auf Zytokinsekretion mittels des „Human Inflammation Antibody Array 3“

Mit Hilfe des „Human Inflammation Antibody Array 3“ der Firma RayBio[®] wurde ein Screen auf 40 verschiedene Entzündungsfaktoren durchgeführt, der, nach Angaben des Herstellers, mit einem Minimum von z. B. 4pg/ml für MCP-1 entsprechende Faktoren detektieren kann. Antikörper gegen die verschiedenen Mediatoren waren jeweils in 2-fach Bestimmung auf der Membran enthalten und konnten nach dem Prinzip des „Sandwich-ELISA“ und einem Chemilumineszenzsignal am Chemiesmart3000-Gerät detektiert werden. Eine Übersicht der Faktoren ist in Abbildung 3.1 gezeigt. Die Durchführung richtete sich nach der Anleitung des Herstellers, wobei der gewonnene Infektionsüberstand (s. 3.2.14.3) unverdünnt oder in einer

MATERIAL UND METHODEN

Verdünnung von 1:2 in Blockierungspuffer auf die vorher abgesättigte Membran gegeben und für 2h bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert wurde.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
2	POS	POS	NEG	NEG	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
3	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
4	IL-1 β	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70
5	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
6	IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
7	RANTES	TGF- β I	TNF- α	TNF- β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-88	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS
8	RANTES	TGF- β I	TNF- α	TNF- β	s TNF RI	s TNF RII	PDGF-88	TIMP-2	BLANK	BLANK	NEG	POS

Abbildung 3.1: Übersicht der 40, auf der Membran des „*Human Inflammation Antibody Array 3*“ der Firma RayBio®, enthaltenen Entzündungsfaktoren.

Nach fünfmaligem Waschen mit 2 unterschiedlichen Puffern wurde die Primärantikörperlösung mit biotinkonjugierten Zytokinantikörpern für 2h bei RT geschwenkt. Es folgte ein weiterer Waschzyklus, dem sich eine Inkubation (2h RT) der Membran mit HRP-fusioniertem Streptavidin anschloss. Nach erneutem Waschen wurde die Membran umgehend mit Substratlösung inkubiert und die entstandene Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Mit der Bio1D Software (s. Tabelle 3.19) wurden die Spots anschließend densitometrisch und mit Hilfe der an den Assay angepassten „*Human Inflammation Antibody Array III and 3.1 Analysis Tool*“ Software rechnerisch ausgewertet.

3.2.16.2. Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels ELISA

Zur quantitativen Bestimmung der IL-8 Sekretion wurde ein „*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“ (ELISA) der Firma BD Bioscience verwendet. Hierfür wurde hochreiner IL-8 Antikörper („*Capture Antibody*“) für ca. 24h an spezielle Immunomikrotiterplatten (s. Tabelle 3.2) gebunden. Nach Blockierung der freien Bindungsstellen mit im Kit enthaltenem Tierserum (1h RT) und dreimaligem Waschen mit detergenzhaltigem Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit 100 μ l verdünnten Infektionsüberständen für 2h bei RT. Je nach MOI oder Molarität der Lysophospholipide mussten die Überstände 1:200 bis 1:400 in Tierserum verdünnt werden, die uninfizierte A549 Kontrolle wurde grundsätzlich 1:20 eingesetzt. Gereinigtes IL-8 Protein wurde als Standard zur Quantifizierung bei jedem Experiment mitgeführt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, die Wells 5 \times mit Waschpuffer gewaschen und je 100 μ l der Detektionslösung, biotinhaltiger Detektionsantikörper mit Streptavidin-HRP-Konjugat, zu den Ansätzen gegeben. Nach 1h Inkubation bei RT erfolgten 7 Waschschrte und die Farbentwicklung nach Zugabe der Substratreagenzien. Je nach Intensität wurde die Reaktion nach 10 – 30min durch Zugabe von

50µl phosphorsäurehaltiger Stopplösung terminiert und die Absorption der Wells bei einer Wellenlänge von 450nm ausgelesen.

3.2.17. Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Stämme *L. pneumophila* Corby (pBCKS), die *plaB* Mutante *plaB1* (pBCKS) und die Komplementante *plaB1* (pJB04) wurden auf BCYE-Agarplatten für 7 Tage bei 30°C kultiviert. Anschließend wurde eine Bakteriensuspension in PBS auf eine finale OD₆₆₀ von 0,3 eingestellt und 500µl dieser Suspension für 5min bei 5.000rpm sedimentiert. Das Pellet wurde in 250µl einer 3%igen PFA-Lösung suspendiert und nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 250µl PBS-Puffer vermischt und bei 4°C gelagert. Zur Immunfärbung wurden 30µl der Suspension auf einem Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger angetrocknet und in PBS gewaschen. Die anschließende Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 30min bei 37°C mittels 3% BSA in PBS, supplementiert mit 0,2% Tween 20 (PBS-T). Nach einem Waschschriff (10min) in PBS-T wurde der primäre Antikörper (anti-FlaA aus Kaninchen) in einer Konzentration von 1:500 (in PBS-T) für 30min bei 37°C zugegeben. Nach erneutem Waschen (3×5min), der Inkubation mit dem sekundären Antikörper anti-Kaninchen-Alexa488 (1:300 in PBS-T), und letzten Waschschriffen (3×5min) wurde der Objektträger erneut getrocknet. Die Versiegelung erfolgte mit dem *ProLong Antifade* Reagenz, welches zusätzlich den Farbstoff DAPI enthielt. Nach Trocknung der Proben über Nacht bei Raumtemperatur wurden die Ansätze am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.2.18. FT-IR Spektroskopie

Für die Untersuchung der Membranzusammensetzung mittels FT-IR Spektroskopie wurden *L. pneumophila* Corby und die *plaB* Mutante *plaB1* entweder in Flüssigkultur (OD₆₆₀ 1,0) oder auf Platte (48 – 144h) kultiviert. Hierzu wurde 1 Impföse Bakterienmaterial von den Mutterplatten entnommen und in 1ml H₂O_{bidest} suspendiert. 500µl der Suspension wurden dann auf frische BCYE α -Agarplatten ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten (s. Ergebnisteil) wurde etwas Zellmaterial in 80µl steriles H₂O eingerieben und 35µl der Suspension auf ein infrarottransperables Probenrad aus Zinkselenid aufgetragen. Durch das Anlegen eines Vakuums von 66mbar im Exikator erfolgte über dem Trocknungsmittel Sicapent die Lyophilisierung der Proben. Der getrocknete Bakterienfilm auf dem Probenrad wurde dann mit einer Deckscheibe aus KBr (wasserlöslich) verschlossen und in das Spektrometer eingesetzt. Die verschiedenen Probenpositionen wurden jeweils gegen eine Negativkontrolle (Probenradposition ohne Bakterien) gemessen. Die Aufzeichnung des

MATERIAL UND METHODEN

Interferogramms unter Verwendung des IF28/B-Spektrometer und des Programmes Opus erfolgte in einem Frequenzbereich von $3000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ und wurde anschließend durch Fourier-Transformation in das dargestellte Spektrum umgewandelt. Diese stellen so den negativen dekadischen Logarithmus des Absorptionsspektrums in *absorbance units* dar, der gegen die Messwellenlänge aufgetragen wurde.

4 Ergebnisse

4.1. Biochemische Analyse von *L. pneumophila* PlaB

Das „screening“ einer Genombank von *Legionella pneumophila* Corby in *E. coli* Zellen führte zu der Entdeckung eines stark lipolytisch und hämolytisch aktiven Proteins. Eine entsprechende Insertionsmutante in *L. pneumophila* zeigte, dass das zugrunde liegende *plaB* Gen für die hauptsächliche zell-assoziierte Phospholipase A/Lysophospholipase A kodiert, mit über 100-fach stärkerer hydrolytischer Aktivität, verglichen zu bisher beschriebenen lipolytischen Enzymen dieses Bakteriums (94). Da PlaB keine Homologie zu bekannten Lipasefamilien aufweist, sollten in dieser Arbeit zur weiteren Charakterisierung vor allem biochemische Ansätze verfolgt, aber auch Analysen zur Funktion des Proteins während einer Legionelleninfektion durchgeführt werden.

4.1.1. Biochemische Eigenschaften von PlaB

4.1.1.1. Das PlaB-Protein

In silico Analysen (s. 3.1.11) zur Folge wird das 1425bp lange *plaB* Gen in ein 474 Aminosäuren-Volllängenprotein translatiert. Das Molekulargewicht beträgt 53,7kDa mit einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 8,38. Berechnungen zur Hydrophobizität nach Kyte-Doolittle (157) zeigten keine möglichen Transmembrandomänen auf, ebenso konnte kein putatives Signalpeptid zur Sekretion von PlaB durch bekannte Sekretionssysteme von Gram negativen Bakterien gefunden werden (SignalP 3.0). Vorhersagen zur subzellulären Lokalisation mittels ProtComp (Softberry) weisen jedoch auf eine Assoziation des Proteins mit der äußeren Membran über insgesamt 10 Transmembransegmente [Aminosäure (AS) 112:125 – 144:163 – 170:187 – 197:219 – 236:255 – 262:285 – 308:324 – 337:355 – 373:393 – 408:430] hin. Allerdings erstrecken sich zwei der Transmembrandomänen über den Motivbereich der aktiven Aminosäuren Asp-203 und His-251 (s. 4.1.3). Daher ist die Vorhersage mittels ProtComp mit Vorsicht zu behandeln. Lokalisationsstudien belegen trotz allem eine assoziierte oder integrale Verankerung von PlaB an der äußeren Membran von *L. pneumophila* (247). Ob PlaB an seinem Bestimmungsort durch Dimerisierung oder weitere Prozessierungen seine Aktivität entwickelt, ist nicht bekannt. Fünf N-Glykosylierungs- [AS 26 – 162 – 214 – 297 – 435] als auch 7 putative N-Myristoylierungsstellen [AS 76 – 120 – 140 – 154 – 244 – 248 – 257] zeigen Ansatzpunkte für posttranslationale Modifikation und/oder Membranverankerungen (PSITE, Softberry). Für die N-Myristoylierung bedarf es

allerdings eines N-terminalen Glyzinrestes, die angegebenen Aminosäuren befinden sich jedoch im Inneren des Proteins. Zudem ist diese Art der Modifikation in Prokaryonten noch nicht bekannt. Im Weiteren weist eine „coiled coil“ Region im Bereich von Aminosäure 283-309 auf eine mögliche Dimerbildung hin (COILS Server, s. Tabelle 3.19). Somit könnte ähnlich zur „outer membrane phospholipase A“ (OMPLA) aus *E. coli* die Dimerisierung von PlaB ausschlaggebend für die Entwicklung voller hydrolytischer Aktivität sein.

4.1.1.2. Konstruktion des Komplementationsvektors pJB04

In der vorliegenden Arbeit wurde, soweit nicht anders erwähnt, ausschließlich *Legionella pneumophila* Corby PlaB untersucht. Da in dem kürzlich konstruierten Vektor pKH192 (94) ein Aminosäureaustausch an Stelle 101 der Proteinsequenz vorliegt [(aat)N→(agt)S], wurde in dieser Arbeit ein neuer Komplementationsvektor konstruiert. Hierzu wurde *L. pneumophila* Corby *plaB* von genomischer DNA und mit den Primern *plaB_SalI*f und *plaB_EagI*r amplifiziert und unter Nutzung der gleichen Schnittstellen in den Vektor pBCKS (Stratagene) ligiert. Nach erfolgter Sequenzierung wurde der resultierende Vektor pJB04 sowohl in die *plaB* Mutante *plaB1* [*plaB1*(PlaB)] als auch in den Wildtyp [Corby(PlaB)] eingebracht. Als Kontrollen dienten die jeweiligen, mit dem Leervektor (LV) transformierten Stämme.

4.1.1.3. Lipidhydrolyse-Profil von PlaB

Phospholipolytische Aktivitäten werden anhand der freigesetzten Fettsäuren (FFA) aus Phospholipidsubstraten (PLA-Aktivität) oder Lysophospholipidsubstraten (LPLA-Aktivität) bestimmt, die der „echten“ Lipasen anhand der Fettsäuren aus unpolaren Lipidmolekülen.

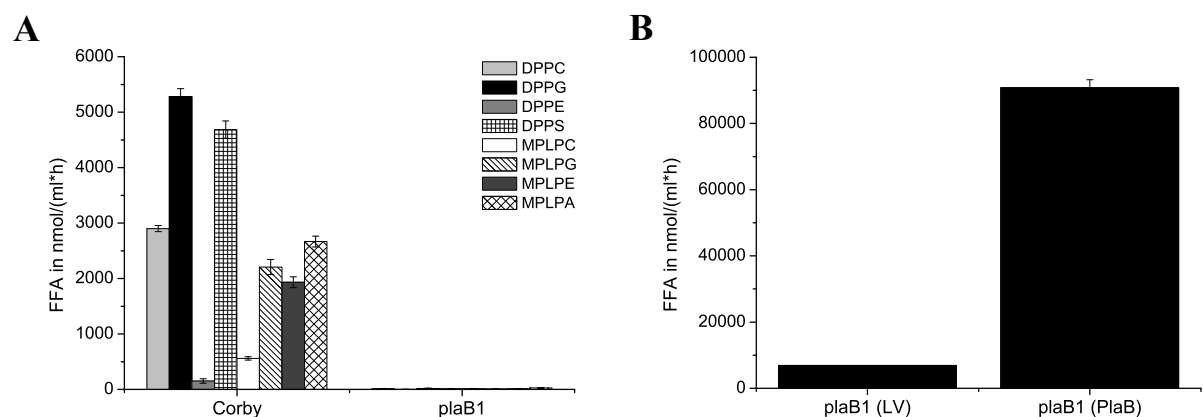


Abbildung 4.1: Lipidhydrolyseprofil von *L. pneumophila* Corby PlaB.

Das hydrolytische Potential von *L. pneumophila* Corby PlaB wurde durch Freisetzung von Fettsäuren (FFA) aus verschiedenen Lipidsubstraten bestimmt. A) Hydrolyseeigenschaften von Wildtyp und *plaB* Mutante nach Inkubation mit Phospholipiden (DPPC, DPPG, DPPE, DPPS) und Lysophospholipiden (MPLPC, MPLPG, MPLPE; MPLPA). Um die Löslichkeit der Lipide zu verbessern, wurde bei diesem Experiment eine Lipidkonzentration von 1mM gewählt. B) Hydrolyse von Cardiolipin durch *L. pneumophila* *plaB* Mutante *plaB1* (LV) und Komplementante *plaB1* (PlaB). Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von mindestens 2 Wiederholungen. LV=Leervektor pBCKS

Die hydrolytische Aktivität von PlaB bezieht sich fast ausschließlich auf Phospholipid- oder Lysophospholipidsubstrate (Abb. 4.1). Hier wurden vor allem Phospholipide mit einer negativen Nettoladung, wie z. B. Phosphatidylglyzerol (DDPG), Phosphatidylserin (DPPS) und Lysophosphatidsäure (MPLPA), hydrolysiert. Phosphatidylethanolamin (DPPE), ein bipolares Lipid, ohne Nettoladung bei pH neutralen Bedingungen, wurde nur schwach, Lysophosphatidylethanolamin (MPLPE) dagegen in weitaus größerem Maßstab gespalten (Abb. 4.1 A). Tendenziell zeigte sich eine Affinität des Enzyms für Lipidsubstrate mit negativer Nettoladung, jedoch lässt sich keine generelle Aussage über die Präferenz treffen, da auch bipolare Lipide, wie z. B. Phosphatidylcholin (DPPC) oder MPLPE, von PlaB hydrolysiert werden konnten. Weiterhin zeigte das Enzym Hydrolysepotential gegenüber dem Diphosphatidylglyzerin Cardiolipin (Abb. 4.1 B), Lipidsubstrate wie 1-MPG, 1,2-DG und TG wurden dagegen nur sehr geringfügig oder nicht umgesetzt (nicht gezeigt).

4.1.1.4. Selektivität gegenüber Variationen in der Fettsäurekettenlänge

Aus dem Lipidhydrolyse-Profil von PlaB lässt sich erkennen, dass das Enzym relativ spezifisch zwischen Lipidkopfgruppen differenzieren kann. OMPLA aus *E. coli* akzeptiert ebenso eine Vielzahl an Substratkopfgruppen, verhält sich aber selektiv gegenüber der Azyklkettenlänge im Lipidmolekül (258). Zur Untersuchung, ob PlaB auch Selektivität in Bezug auf die Fettsäurekettenlänge besitzt, wurde Lysophosphatidylcholin mit Azyklresten von C8, C12 und C16 Kohlenstoffatomen im Hydrolyseassay auf Freisetzung der entsprechenden Fettsäure überprüft. Abbildung 4.2 zeigt, dass durch PlaB bevorzugt Substrate mit einer Mindestanzahl von 12 Kohlenstoffatomen hydrolysiert wurden. Monoctanoylphosphatidylcholin (C8) wurde unter diesen Bedingungen nicht von PlaB gespalten (Abb. 4.2).

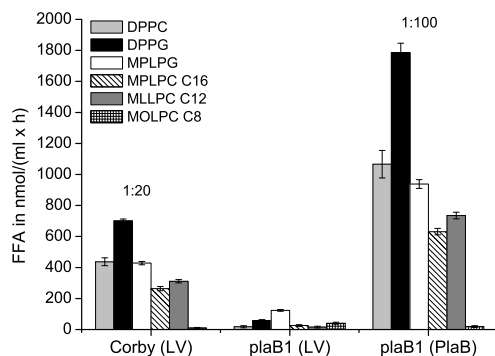


Abbildung 4.2: Selektivität von PlaB gegenüber Fettsäurekettenlängen in Lysophospholipidsubstraten.

Zelllysate von *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *plaB* Mutante und Komplementante wurden mit Lysophosphatidylcholinsubstraten unterschiedlicher Fettsäurekettenlänge inkubiert und die Freisetzung von Fettsäuren bestimmt. Als interne Kontrollen wurden die Phospholipide DPPC und DPPG und das Lysophospholipid MPLPG mitgeführt. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von 2 Wiederholungen und wurden experimentell durch p-Nitrophenolsubstrate verifiziert. Abkürzung: LV = Leervektor pBCKS.

Ähnliche Ergebnisse konnten auch durch Verwendung von p-Nitrophenolsubstraten mit Fettsäurekettenlängen von 4, 12 und 16 Kohlenstoffatomen erzielt werden (nicht gezeigt).

4.1.2. Sequenzhomologie von PlaB und PlaB-ähnlichen Proteinen

Alle bisher annotierten Genome von *L. pneumophila* (Corby, Paris, Lens, Philadelphia-1) tragen das Gen für die Phospholipase PlaB. Dabei weisen die Stämme Paris, Lens und Philadelphia-1 eine Homologie von mindestens 99% und eine Identität von mindestens 98% zum PlaB Protein von Stamm Corby auf. Erst die ‚nächsten Verwandten‘, die nicht-*pneumophila* Stämme *L. spiritensis* und *L. drancourtii* LLAP12, kodieren für PlaB-Proteine mit etwas erniedrigter Homologie (H 94% beide) und Identität (I 89% bzw. I 87%). Interessanterweise zeigt *L. drancourtii* PlaB eine N-terminale Extension von 24 Aminosäuren. Durch BLAST Analysen der NCBI Datenbank konnten weitere PlaB-ähnliche Proteine ermittelt werden. Diese beinhalten putative Phospholipasen aus *Psychromonas ingrahamii* (H 62%, I 44%), *Desulfuromonas acetoxidans* (H 60%, I 43%) und *Shewanella pealeana* (H 60%, I 42%) oder hypothetische Proteine aus *Persephonella marina* (H 46%, I 29%), *Maricaulis maris* (H 44%, I 28%) und dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (H 41%, I 28%) sowie aus weiteren *P. aeruginosa* Stämmen. Jedoch konnte keine Homologie von PlaB zu bereits beschriebenen Phospholipasen festgestellt werden. Ebenso weisen putative katalytisch wichtige Aminosäuremotive erhebliche Unterschiede zu bekannten bakteriellen und eukaryontischen Lipasen auf (9,142). Aufgrund dessen war es im Folgenden von Interesse, ob PlaB aus *L. pneumophila* analog zu anderen lipolytischen Proteinen eine katalytische Triade zur effektiven Hydrolyse von Lipidsubstraten besitzt und ob PlaB und Homologe durch die neuartigen konservierten, die Aminosäuren umgebenden Motive eine neue Klasse an lipidhydrolysierenden Enzymen repräsentieren.

4.1.3. Bestimmung der katalytisch relevanten Aminosäuren von PlaB

Lipasen oder Phospholipasen enthalten in ihrer Proteinsequenz hoch konservierte Domänen, welche die katalytisch wichtigen Aminosäuren einbetten. Diese sind häufig als katalytische Triade aus einem Nukleophil (Serin, Aspartat oder Cystein), einer ‚sauren‘ Aminosäure (Aspartat oder Glutamat) und einem Histidin zusammengesetzt (9,282,292). Neben Triaden sind auch katalytische Diaden bekannt, so z. B. die Kombination aus Serin und Aspartat bei Patatinen, einer Lipasefamilie aus der Kartoffelknolle (231). Interessanterweise kodiert *L. pneumophila* für 11 Patatin-ähnliche Proteine (PLP), die mit weiteren bakteriellen PLPs in einer neuen Klasse lipolytischer Enzyme zusammengefasst werden können (15).

ERGEBNISSE

In *L. pneumophila* PlaB konnten verschiedene Motive ausfindig gemacht werden, die putativ katalytisch relevante Aminosäuren umgeben. In Bezug auf das nukleophile Serin entspricht jedoch keine dieser Aminosäureabfolgen den typischen GX SXG oder GDSL Motiven bekannter bakterieller oder eukaryonter Enzyme (9). Abbildung 4.3 fasst lipase- und phospholipaseähnliche Motive in PlaB zusammen, die im Folgenden durch Basenpaarsubstitution in ihrer Aminosäuresequenz verändert wurden.

Serin	AS	Aspartat	AS	Histidin	AS
TH S TG	85	LRD G QR	75	FV H GW	7
GK S RL	129	WLD Y DC	167	LS H SG	251
GE S GS	200	GSD G VV	203	AT H PT	270
GE S LV	229	LID Y DL	342	GN H LI	339
GL S HS	250	FLD Y DI	381	IL H PN	433

Abbildung 4.3: Sequenzmotive von putativ katalytisch wichtigen Aminosäuren in *L. pneumophila* Corby PlaB und ihre Lokalisation im Protein.

PlaB unterscheidet sich von bisher beschriebenen bakteriellen Lipasefamilien in der Sequenz der Motive, die putativ wichtige Aminosäuren (Serin, Aspartat und Histidin) umgeben. Dargestellt sind diejenigen Reste in PlaB, die veröffentlichten Motiven ähneln und im Folgenden durch Basenpaarsubstitution mutiert werden sollten. Die relevanten Aminosäuren sind ‚fett‘ unterlegt und ihre Aminosäurepositionen (AS) im PlaB-Protein angegeben.

4.1.3.1. ‚Site-directed mutagenesis‘ von PlaB

Durch Basenpaarsubstitution wurden relevante Aminosäuren ersetzt, so dass sich zwar das Ladungsverhalten oder der hydrophile Charakter verändert, nicht jedoch die sterischen Eigenschaften, um die Wahrscheinlichkeit einer Alteration der Sekundärstruktur weitgehend zu minimieren. Serinreste wurden demnach durch Alanin, Aspartat und Histidin durch Asparagin ersetzt. Dies erfolgte mittels der Methode der „combined chain reaction“, einer speziellen PCR-Technik (27). Hierbei wird ein dritter Primer, der die entsprechende Mutation trägt, mit Hilfe einer thermostabilen Ligase während des PCR-Vorgangs mit dem fortlaufenden Strang verknüpft. Auf diese Weise konnten 17 PlaB-Mutanten hergestellt werden, die analog zur Wildtyp PlaB-Kontrolle sowohl in *E. coli* DH5α als auch in der *L. pneumophila* Corby *plaB* Mutante *plaB1* exprimiert wurden. Die Fähigkeit der Mutantenzymen, Lipidsubstrate zu hydrolysieren, wird im nächsten Abschnitt vorgestellt.

4.1.3.2. Lipolytische Aktivität von PlaB-Mutanten

Wie bereits gezeigt, entfaltet PlaB vor allem hydrolytische Aktivität gegenüber Phospholipid- und Lysophospholipidsubstraten. Daher wurden konstruierte „site-directed“ PlaB-Mutanten auf Lipolyse bezüglich DPPG/DPPC und MPLPG/MPLPC hin untersucht. Von je 5 veränderten Ser-, Asp- und His-Resten (s. Abbildung 4.3) zeigten sich die Mutanten S85A, D203N und H251N zu mehr als 99% in ihren hydrolytischen Eigenschaften reduziert (Abb. 4.4 A). Sie repräsentieren demnach eine katalytische Triade, wie sie für die meisten lipolytischen Enzyme beschrieben wurde.

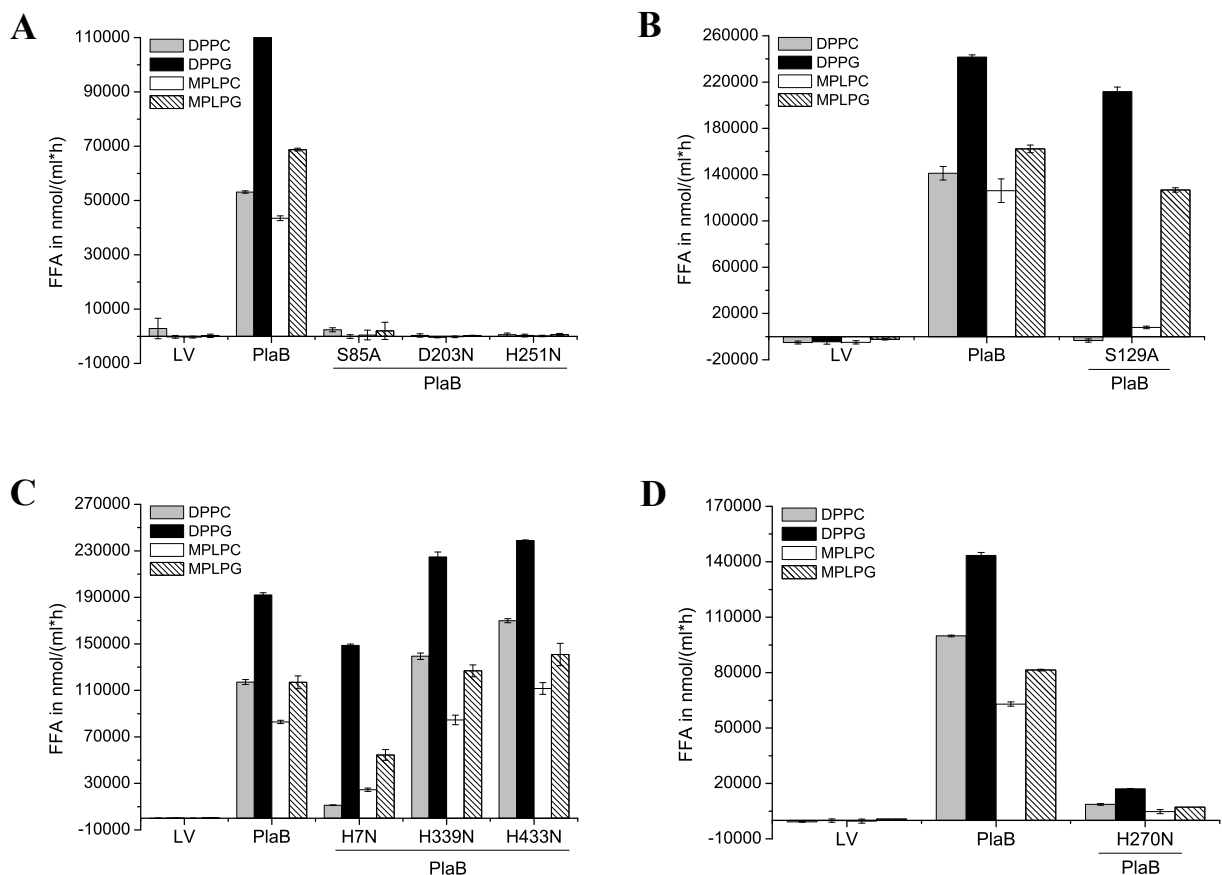


Abbildung 4.4.: Lipidhydrolyseprofile von PlaB-Mutanten mit Auswirkung auf die lipolytische Aktivität des Enzyms.

Mutierte PlaB Enzyme wurden in *L. pneumophila* plaB Mutante plaB1 zur Expression gebracht und Zelllysate auf veränderte lipolytische Eigenschaften untersucht. Dargestellt ist die Freisetzung von Fettsäuren durch PlaB Mutantenproteine im Vergleich zu den Leervektor pBCKS (LV)- und Wildtyp-PlaB tragenden Kontrollen (PlaB). A) Substitution von Ser-85, Asp-203 oder His-251 führte zu fast vollständigem Aktivitätsverlust (>99%) des PlaB Enzyms. Sie repräsentieren demnach das aktive Zentrum. B) + C) Ser-129 und His-7 Substitutionen reduzieren die Fähigkeit der Mutanten Phospho- und Lysophospholipide mit Cholinseitenketten zu hydrolysieren. His-339 und His-433 zeigen keine Veränderung der Aktivität nach erfolgter Mutation. D) Der Austausch von His-270 reduziert die Aktivität gegenüber den verwendeten Phospholipid (DPPG, DPPC)- und Lysophospholipidsubstraten (MPLPG, MPLPC) auf 10% der Wildtyp-PlaB-Aktivität. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von mindestens 3 Experimenten in *Legionella* und wurden durch Expression der Gene in *E. coli* DH5α bestätigt.

Die Relevanz dieser Aminosäuren wurde durch die strikte Konservierung entsprechender Reste in allen PlaB-Homologen noch unterstrichen (s. Abb. 4.6).

ERGEBNISSE

Im Weiteren konnten Ser-129, His-7 und His-270 identifiziert werden, die für die Entwicklung voller lipolytischer Aktivität von Bedeutung sind. Durch Substitution von Ser-129 und His-7 wurde die Hydrolyseeigenschaft gegenüber Substraten verringert, die Cholinseitenketten am Phosphodiester tragen (Abb. 4.4 B/C). Im Falle von DPPC reduzierte sich die Aktivität gegenüber dem Lipid bei Mutante H7N um 80%, bei S129A sogar um fast 100%. Zu ca. 60% (H7N) und 80% (S129A) weniger effizient wurde MPLPC von den Mutanten umgesetzt. Die Hydrolyse von DPPG blieb fast unverändert (reduziert zu 10% bei H7N bzw. 12% bei S129A), wohingegen die Eigenschaft, MPLPG zu spalten, etwas beeinflusst wurde (reduziert zu 43% bei H7N bzw. 22% bei S129A). Ein weiteres Histidin, His-270, konnte in einem HPT-Motiv aus GDSL-Hydrolasen lokalisiert werden (282). Substitution mit Asparagin reduzierte drastisch die PlaB-Aktivität der Mutante auf verbleibende 10% im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4.4 D).

Andere Substitutionen, wie z. B. S200A, S229A, S250A, D75N, D167N, D432N, D381N, H339 oder H433N, zeigten keinen Einfluss auf das Hydrolysepotential oder -Profil von PlaB (Abb. 4.4 C und 4.5 A/B).

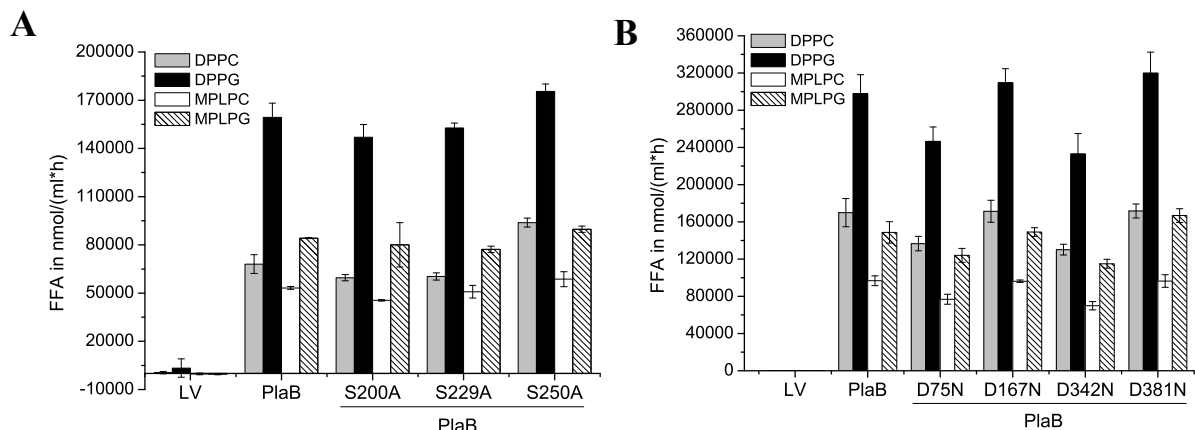


Abbildung 4.5: Lipidhydrolyse von mutierten PlaB-Enzymen ohne gravierende Auswirkung auf die lipolytischen Eigenschaften.

Mutierte *plaB*-Gene wurden in *L. pneumophila* *plaB1* exprimiert und Zelllysate auf die Freisetzung der Fettsäuren aus PL und LPL Substraten untersucht. Alle gezeigten Aminosäuresubstitutionen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die lipolytischen Eigenschaften der Mutanten und setzten Fettsäuren in vergleichbarer Menge zu dem Wildtyp-PlaB-exprimierenden Stamm (PlaB) frei (A + B). Die Daten repräsentieren Doppelwerte von mindestens 3 Experimenten in *Legionella* und wurden durch Expression der Gene in *E. coli* DH5a bestätigt. LV = Leervektor pBCKS.

Offensichtlich besitzt PlaB eine klassische katalytische Triade aus Ser, Asp und His für effektive Hydrolyse von Lipidsubstraten, die sich jedoch wesentlich von anderen lipolytischen Enzymen unterscheidet. Das beruht, neben den konservierten Motiven um Aspartat und Histidin, vor allem auf einem Threoninrest, der in unmittelbarer Nachbarschaft zu dem katalytisch aktiven Serin lokalisiert ist (Abb. 4.6).

ERGEBNISSE

Das umgebende Motiv kann als THSTG beschrieben werden, welches zwar ähnlich zu bekannten GX SXG Motiven ist, sich aber durch Threonin anstelle von Glyzin deutlich hervorhebt. Aus diesem Grund wurde Thr-83 durch Gly substituiert und veränderte Lipidhydrolyse dokumentiert (Abb. 4.7 A). Die Wiederherstellung des lipasebasierenden Motivs (GX SXG) führte zu einer signifikanten Reduktion von über 95% ursprünglicher Wildtyp-Aktivität (Abb. 4.7 A).

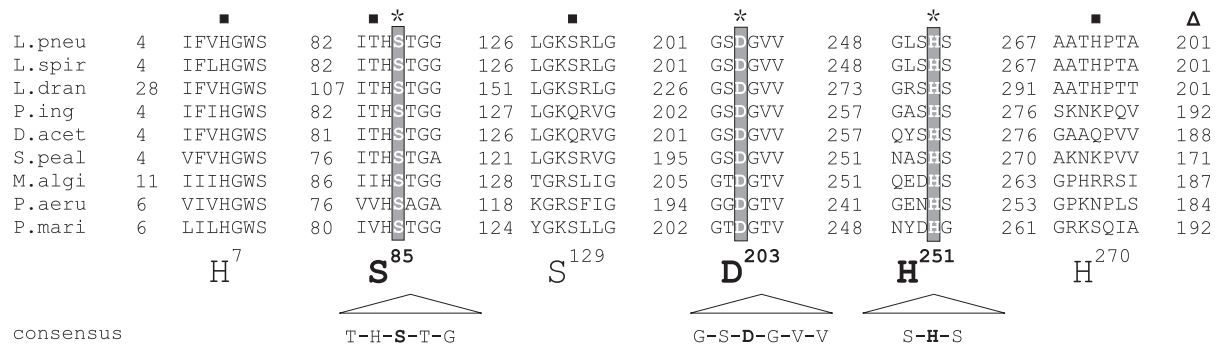


Abbildung 4.6: Sequenzvergleich und resultierende Konsensussequenz der katalytischen Triade von *L. pneumophila* Corby PlaB und PlaB-Homologen.

Aminosäuren, relevant für die lipolytische Aktivität von *L. pneumophila* Corby PlaB wurden den homologen Bereichen putativer Phospholipasen oder hypothetischer Proteine nach BLAST-Analyse gegenüber gestellt. Die konservierten Aminosäuren des katalytischen Zentrums sind durch dunkelgraue Schattierungen und Sternchen (*) hervorgehoben. Die resultierende Konsensussequenz beruht auf Aminosäureresten, die am Häufigsten an dieser Position in PlaB und Homologen detektiert werden konnten. Weitere Aminosäuren, wichtig für die hydrolytische Aktivität von PlaB, sind mit einem Quadrat markiert (■). Die Nummern zwischen den homologen Bereichen geben die erste Aminosäure des jeweiligen Homologieabschnittes wider. Der letzte Zahlenabschnitt hingegen spiegelt die Anzahl der restlichen Aminosäuren in den entsprechenden Enzymen wider und ist mit einem Dreieck gekennzeichnet (Δ). Abkürzungen: *Legionella pneumophila* (L.pneu), *Legionella spiritensis* (L.spir), *Legionella drancourtii* LLAP12 (L.dran), *Psychromonas ingrahamii* (P.ing), *Desulfuromonas acetoxidans* (D.acet), *Shewanella pealeana* (S.peal), *Marinobacter algicola* (M.algi), *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (P.aeru) and *Persephonella marina* (P.mari). Volllängen-Sequenzvergleich siehe Anhang.

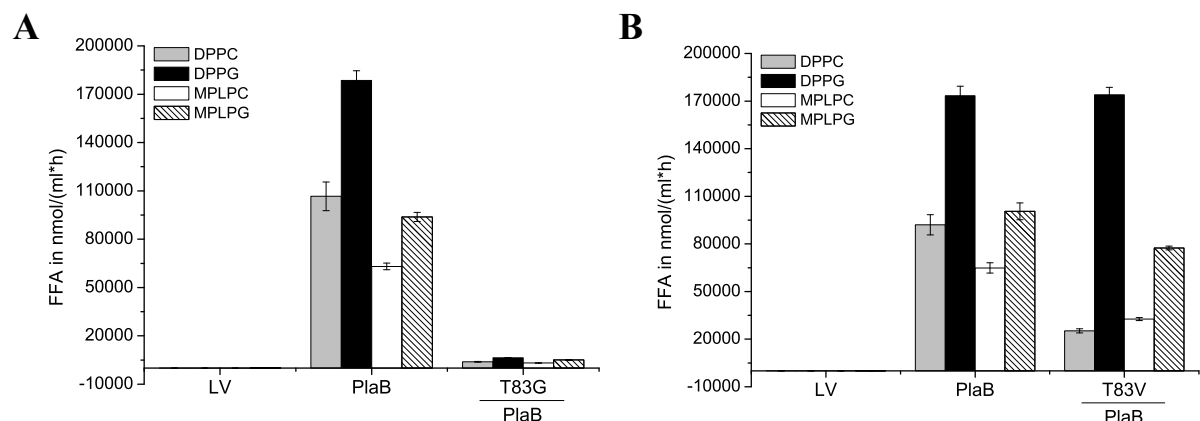


Abbildung 4.7: Bedeutung der Aminosäure Threonin-83 im Konsensusmotiv THSTG des aktiven Serinrestes Ser-85.

Mutierte *plaB* Gene wurden in der *plaB* Mutante *L. pneumophila* *plaB1* exprimiert und die Freisetzung von Fettsäuren aus Lipidsubstraten gemessen. A) Die Wiederherstellung des typischen Lipasemotivs GX SXG durch T→G Substitution reduzierte die Aktivität von PlaB um ~95% verglichen zur Aktivität des Wildtypproteins (PlaB). B) Austausch von Threonin durch Valin beeinflusste die Substratspezifität von PlaB. Die Mutante T83V war reduziert in der Fähigkeit cholintragende Lipide zu hydrolysieren. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von mindestens 3 Experimenten in *Legionella* und wurden durch Expression der Gene in *E. coli* DH5α bestätigt. LV = Leervektor pBCKS.

ERGEBNISSE

Um zu überprüfen, ob sich die Substratspezifität durch diese Mutation gegenüber klassischen Lipasesubstraten geändert hat, wurde zusätzlich die Freisetzung von Fettsäuren aus 1,2-DG und TG untersucht. Die Mutation zum typischen Lipasemotiv hatte allerdings keinen Einfluss auf diese spezielle Aktivität von PlaB, welches nach wie vor im Vergleich zu polaren Phospholipiden apolare Lipasesubstrate nicht oder kaum umsetzen konnte (nicht gezeigt, (94)). Die Bedeutung von Threonin für die Aktivität von PlaB, macht dieses Enzym unter bisher bekannten Phospholipasen einzigartig. Interessanterweise zeigen PlaB-Homologe aus *P. aeruginosa* eine weitere Variation an dieser Position (Abb. 4.6). Hierbei ersetzt ein hydrophober Valinrest das hydrophile Threonin. Durch Mutation von Thr-83 zu Val konnte gezeigt werden, dass erneut die cholinspezifischen Lipolyseeigenschaften von PlaB um bis zu 70% verringert wurden. Ob nun entsprechende *P. aeruginosa* Homologe ein ähnliches Hydrolyseprofil aufweisen wie *L. pneumophila* PlaB T83V und ebenso stark DPPG spalten können, ist noch nicht bekannt.

Mutationen im katalytischen Zentrum von PlaB führten zu Aktivitätsverlusten von über 99% (s. Abbildung 4.4 A.). Nach längeren Inkubationszeiten jedoch war PlaB-abhängige Phospholipaseaktivität im Vergleich zur Leervektorkontrolle immer noch messbar (Abb. 4.8 B). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des Proteins in verschiedenen Infektionsmodellen. Geringe Restaktivität war daher für nachfolgende Experimente hinderlich. Des Weiteren war es von Interesse, ob andere Aminosäuren neben denen der Triade für katalytische Prozesse wichtig sind. Aufgrund dessen wurde der Versuch unternommen, „loss of function“ Mutanten des PlaB-Enzyms herzustellen.

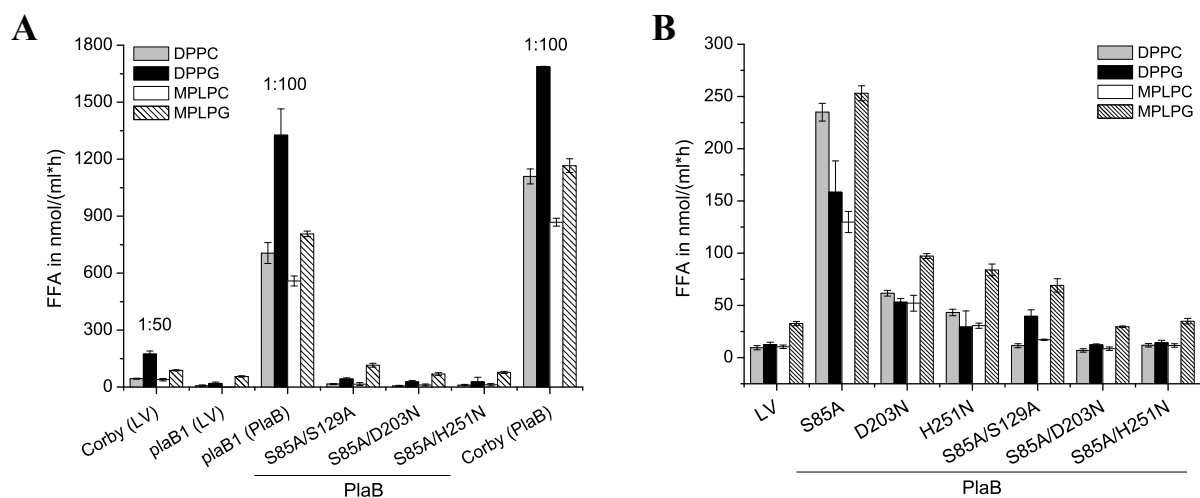


Abbildung 4.8: Lipidhydrolyse der „loss of function“ Mutanten des PlaB-Enzyms.

A) Doppelmutanten des katalytischen Zentrums (S85A/D203N und S85A/H251N) und eine Serindoppelmutante (S85A/S129A) wurden auf ihr Potential untersucht, Fettsäuren aus Lipidsubstraten freizusetzen. Als interne Kontrollen wurden die Stämme Corby Wildtyp (Corby-LV), die *plaB* Mutante (plaB1-LV), die Komplementante (plaB1-PlaB) und der Überexpressionsklon (Corby-PlaB) mitgeführt. B) Darstellung der freigesetzten Fettsäuren durch die Einfachmutante und

ERGEBNISSE

Doppelmutanten im Vergleich zu der *plaB* Mutante mit Leervektor pBCKS (LV). Die Daten repräsentieren Doppelwerte von 2 Experimenten in *Legionella* und wurden durch Expression der Gene in *E. coli* DH5a bestätigt.

Hierzu wurden zusätzliche Mutationen in PlaB/S85A an den Positionen Asp-203 und His-251 eingebracht. Diese entsprechen den verbleibenden Aminosäuren Aspartat und Histidin des katalytischen Zentrums. Zusätzlich wurde eine Serin-Doppelmutante (S85A/S129A) konstruiert, um zu untersuchen, ob S129A zum Teil den nukleophilen Angriff von Ser-85 kompensieren kann. Wie in Abbildung 4.8 (A+B) dargestellt, waren vor allem die Doppelmutanten S85A/D203N und S85A/H251N nicht mehr in der Lage, Lipide in höherem Maße als die *plaB* Mutante mit korrespondierendem Leervektor zu spalten. Die nun verifizierten „loss of function“ Proteine konnten zur Untersuchung der Funktion von PlaB eingesetzt werden (s. Abschnitt 4.1.3.3 und 4.3.6.2).

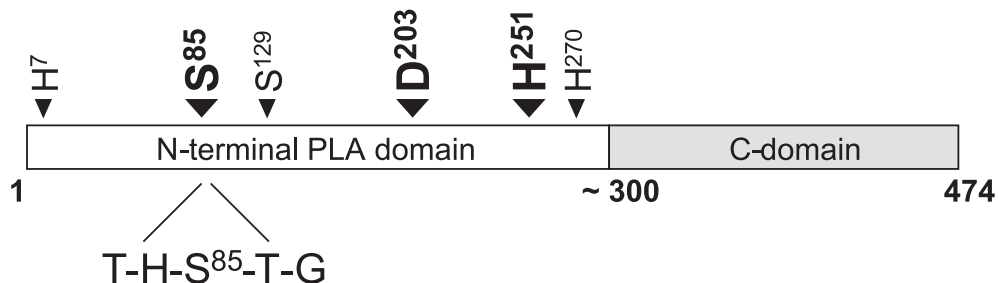


Abbildung 4.9: Verteilung der katalytisch wichtigen Aminosäuren innerhalb des PlaB-Proteins.

Die Lokalisation der Aminosäuren der katalytischen Triade, sowie der Reste wichtig für die Aktivität oder Substratspezifität von *L. pneumophila* Corby PlaB ist schematisch dargestellt. Das Vorkommen wichtiger Aminosäuren beschränkt sich auf den N-terminalen Bereich des Proteins (AS 1 – ca. 300). Damit verbleibt eine C-terminale Domäne unbekannter Funktion (AS ca. 300 – 474).

Die durch gerichtete Mutagenese untersuchten Aminosäuren von *L. pneumophila* PlaB zeigten, dass relevante Proteinreste im N-terminalen Bereich des Enzyms lokalisiert sind (Aminosäure 1-300). Hiermit verbleibt eine C-terminale Domäne von ca. 174 Aminosäuren, über dessen Funktion noch nichts Näheres bekannt ist (Abb. 4.9). Die Region ist zudem innerhalb der PlaB-ähnlichen Proteine weniger stark konserviert. So zeigen die ersten 300 Aminosäuren von *L. pneumophila* Corby PlaB eine Homologie von 66% zu dem PlaB-homologen Enzym von *Desulfuromonas acetoxidans*, der C-terminale und zudem kürzere Bereich (AS 301-474) deckt sich jedoch nur zu 51% mit dem des schwefelreduzierenden Organismus. Die C-Termini von *Marinobacter*, *Persephonella* oder auch *Pseudomonas* PlaB-homologen Enzymen fallen, trotz vorhandener Domäne, unterhalb die durch den Algorithmus festgesetzte Mindesthomologie („threshold“). Sie können daher nicht mehr als signifikant homolog zu PlaB aus *Legionella* angesehen werden (BLASTP, NCBI; Volllängen-Sequenzvergleich s. Anhang).

4.1.3.3. Hämolytische Aktivität von PlaB-Mutanten

Wie bereits gezeigt wurde, trägt PlaB wesentlich zur hämolytischen Aktivität von *L. pneumophila* bei (94). Die Annahme, dass phospholipolytische Aktivität direkt mit hämolytischem Potential einhergeht, scheint begründet. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass der verlängerte C-Terminus eine wesentliche Rolle in der PlaB-vermittelten Zytotoxizität spielt. Aus diesem Grund wurden Mutanten des katalytischen Zentrums auf ihre Fähigkeit hin untersucht, humane Erythrozyten zu lysieren. Hierzu wurden PlaB-Mutantenenzyme in der *L. pneumophila plaB* Mutante plaB1 exprimiert und die Stämme mit humanen roten Blutzellen inkubiert, um anschließend die Freisetzung von Hämoglobin in den Überstand zu messen. Hierbei zeigte sich, dass die Inhibition der katalytischen Aktivität entweder durch die Einfachmutation S85A oder auch durch die Doppelmutation S85A/D230N die hämolytischen Eigenschaften von PlaB aufhebt (Abb. 4.10 A). Die Hämolyse dieser Klone ist vergleichbar mit der *plaB* Mutante, welche nur den Leervektor pBCKS trägt. Die Mutation H433N führte nicht zu einer veränderten lipolytischen Aktivität von PlaB (Abb. 4.4 C) und zeigte daher keinen Einfluß auf das Lysepotential von Erythrozyten im Vergleich zu Wildtyp PlaB (Abb. 4.10 A+B). Interessanterweise war die Mutante S129A (signifikant reduziert in cholinspezifischer Lipidhydrolyse) nicht mehr in der Lage, rote Blutzellen zu lysieren.

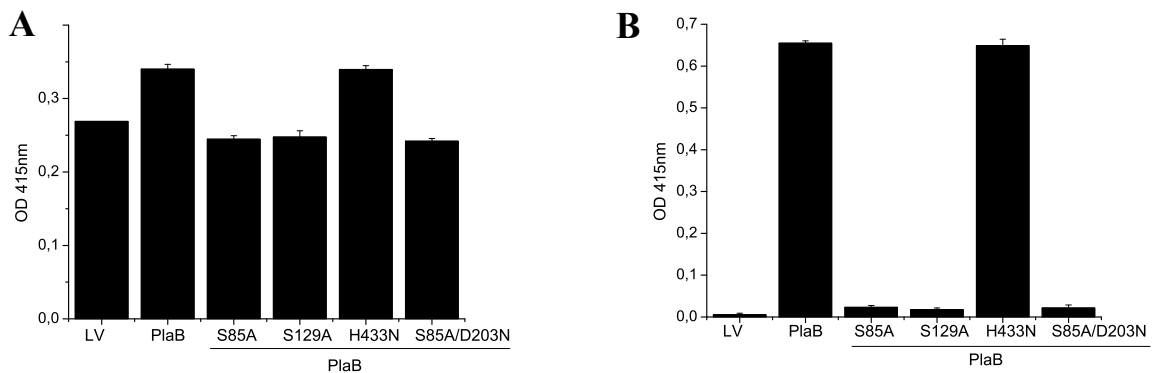


Abbildung 4.10: Hämolytische Aktivität der PlaB-Mutanten.

Humane Erythrozyten wurden mit *L. pneumophila plaB* Mutanten (A) oder *E. coli* DH5α (B) Zellen inkubiert, die Varianten der PlaB-Aminosäuresubstitution exprimierten. Die Freisetzung von Hämoglobin in den Überstand wurde nach einer Inkubationsdauer von 105min (A) oder 18h (B) gemessen. Die Daten sind repräsentativ für Dreifachwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in *Legionella* und in *E. coli* DH5α. LV = Leervektor pBCKS.

Diese Ergebnisse belegten eindeutig, dass die katalytische Aktivität verantwortlich für die hämolytischen Eigenschaften des Enzyms ist. Weiterhin ließ sich erkennen, dass die phosphatidylcholinspezifische Aktivität ausschlaggebend für das zytotoxische Verhalten von PlaB ist. Dies steht mit der Tatsache in Einklang, dass Phosphatidylcholin (PC) das hauptsächliche Phospholipid der äußeren Schicht eukaryonter Zellmembranen darstellt.

ERGEBNISSE

Da *L. pneumophila*, wie in der *plaB* Mutante zu erkennen ist (Abb. 4.10 A), für weitere Hämolsine neben PlaB kodiert, wurden entsprechende Mutanten zur Verifizierung im nicht-hämolytischen Stamm *E. coli* DH5 α exprimiert (Abb. 4.10 B). Der Unterschied im Lyseverhalten zwischen Wildtyp PlaB und den Mutanten S85A, S129A und S85A/D203N war hierbei noch gravierender und konnte demnach ausschließlich der Aktivität von PlaB, unbeeinflusst von anderen Faktoren, zugeschrieben werden.

4.1.4. Relevanz des C-Terminus

Durch Mutagenese bestimmter Aminosäuren wurde gezeigt, dass sich relevante Reste für die Enzymaktivität im N-terminalen Bereich des Proteins befinden und dem C-Terminus daher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Abb. 4.9). Auch PlaB-Homologe besitzen diese Extension, die eventuell durch Modifikationen zur Membranverankerung dienen oder ein Sekretionssignal enthalten könnte.

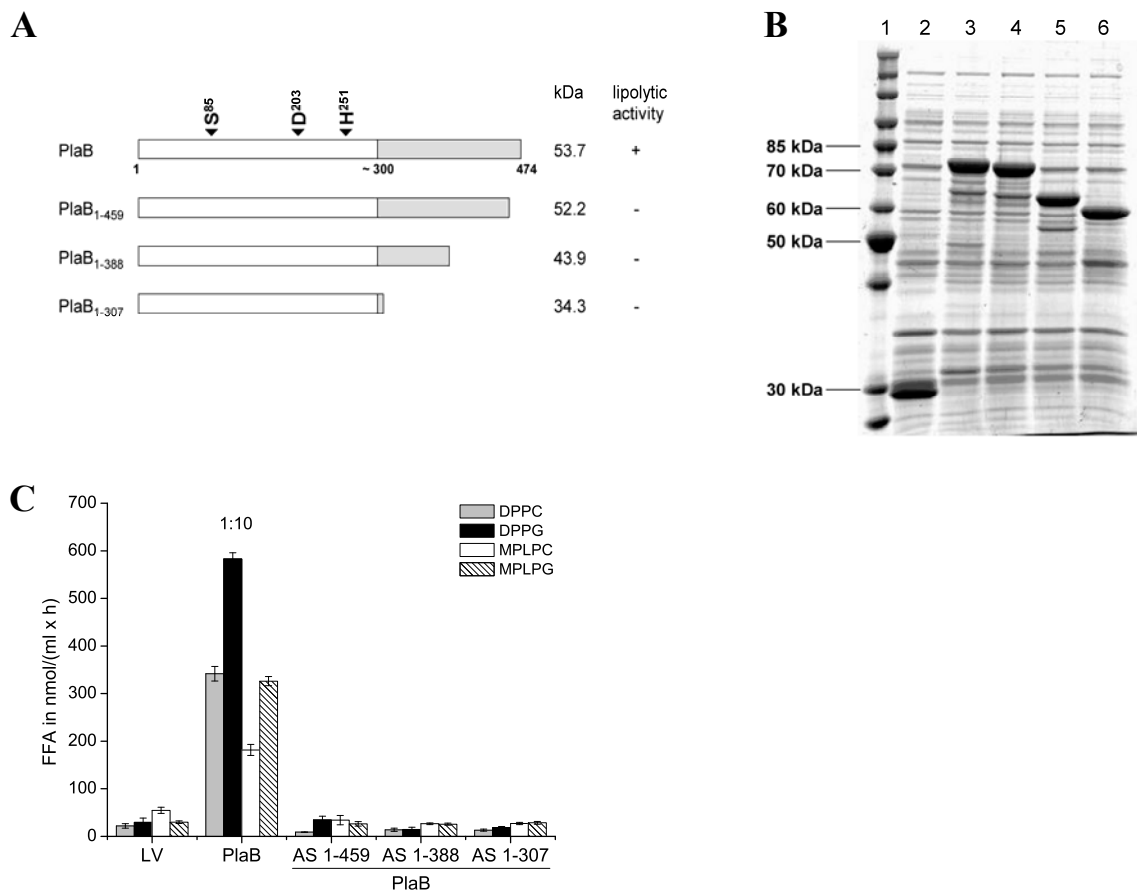


Abbildung 4.11: Relevanz des C-Terminus für die lipolytische Aktivität von PlaB.

A) Übersicht der C-terminal verkürzten Versionen des PlaB-Proteins. Dargestellt sind das resultierende Molekulargewicht und die gemessene hydrolytische Aktivität der Konstrukte. B) SDS-PAGE von *E. coli* BL21 Zelllysaten. Spuren: 1: Standard; 2: GST; 3: GST-PlaB; 4: GST-PlaB₁₋₄₅₉; 5: GST-PlaB₁₋₃₈₈; 6: GST-PlaB₁₋₃₀₇. C) Lipidhydrolyse der *E. coli* BL21 Zelllysate. Das Lysat des Volllängen-konstruktes wurde vor Inkubation 10-fach verdünnt, alle anderen Lysate wurden unverdünnt in den Hydrolyseassay eingesetzt. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

Um den Einfluss der C-terminalen Region auf die Aktivität von PlaB zu untersuchen, wurden drei verkürzte Varianten des Proteins kloniert. Im Vergleich zum Volllängenkonstrukt fehlten den PlaB-Versionen 15, 86 oder 167 Aminosäuren vom C-terminalen Bereich des Enzyms (Abb. 4.11 A). Fusioniert zu einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase (GST)-tag wurden alle Konstrukte in *E. coli* BL21 zur Expression gebracht (Abb. 4.11 B). Hierbei ist zu erwähnen, dass die verkürzten Versionen in Vektor pGEX-6P-1 kloniert, das Volllängenkonstrukt jedoch in Vektor pGEX-5X-1 eingebracht wurde. Das Expressionslevel aller Konstrukte war vergleichbar (Abb. 4.11 B), doch zeigte sich deutlich, dass bereits durch das Fehlen von nur 15 Aminosäuren am C-Terminus keine Aktivität mehr nachweisbar war (Abb. 4.11 C). Alle verkürzten Varianten hydrolysierten PLA und LPLA Substrate vergleichbar zu BL21 Zellen, welche zur Expression von GST ohne fusioniertes PlaB induziert wurden. Dies weist darauf hin, dass die C-terminale Region, ebenso wie die relevanten Aminosäuren im N-terminalen Bereich wichtig für die lipolytische Aktivität von PlaB ist. BLAST Analysen der Aminosäureregion 301-474 ergaben nur geringfügige Homologien, z. B. zu einer O-gekoppelten N-Azetylglykosamintransferase (OGT) mit einem „expect value“ von 2,7. Die Homologie bezieht sich jedoch nur auf einen sehr kurzen Teil des PlaB-Proteins. Zudem weisen OGTs 2 katalytische Domänen auf, die nicht durch PlaB abgedeckt werden (163). Daher ist eine Aktivität als Glykosyltransferase durch PlaB eher unwahrscheinlich.

4.1.5. Expression und Reinigung von PlaB

Zur Bestimmung weiterer biochemischer Eigenschaften und vor allem zur Untersuchung der Funktion und Lokalisation ist die Expression und Reinigung des Proteins notwendig. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Expressionssysteme und ‚Expressionswirte‘ ebenso wie verschiedene Reinigungsmethoden untersucht, um PlaB in Reinform zu gewinnen.

4.1.5.1. Expression in *L. pneumophila*

Unter allen Systemen stellt die Expression von *plaB* im Ursprungswirt *L. pneumophila* die natürlichste Form dar. Bis zum heutigen Datum ist kein Überexpressionssystem für Legionellen erhältlich. Daher konnte eine möglichst große Menge an PlaB-Protein nur mit Hilfe von sogenannten „high copy“ Plasmiden erreicht werden, die in einer Stückzahl von ungefähr 200 Plasmiden pro Zelle vorliegen. Zu diesem Zweck wurde das *plaB*-Gen in Vektor pBCKS kloniert und zur Expression in *L. pneumophila* Wildtyp Corby und der *plaB* Mutante gebracht. So erhaltene Proteine wurden in vergleichender SDS-PAGE und

anschließender Silberfärbung analysiert. Hier zeigte sich, dass das Proteinlevel von PlaB durch die hohe Kopienzahl nicht beeinflusst wurde. Es konnten keine Proteinbanden auf entsprechender Höhe von ~54 kDa zwischen den *plaB*-exprimierenden Stämmen und denen, die den Leervektor trugen, festgestellt werden. Zudem war der Großteil an gemessener Aktivität nach erfolgter Zelllyse in der unlöslichen Fraktion enthalten. Um genügend Mengen an PlaB für eine anschließende Reinigung zu erhalten, wurde daher beschlossen, Systeme aus *E. coli* und *P. pastoris* zu verwenden.

4.1.5.2. Expression in *E. coli*

Für die Expression von Proteinen in *E. coli* BL21 Zellen ist eine Vielzahl an verschiedenen Vektoren erhältlich. Daher wurde eine Reihe von Fusionsproteinen hergestellt, die eine anschließende Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglichen. Hierbei wurden N- und C- terminale Fusionen zu His₆-tags (Vektoren pET160/GW/D-TOPO und pBAD202/D/TOPO) und eine N-terminale Fusion zur Glutathion-S-Transferase (GST in Vektor pGEX-5X-1) aus *Schistosoma japonicum* konstruiert. Zudem wurde *plaB* in Vektor pET160/GW/D-TOPO ohne jegliche Fusion zur Expression gebracht und versucht mittels Ionenauschromatographie anzureichern und zu reinigen. Schon die ersten Expressionsstudien aller Varianten zeigten, dass *plaB* zwar in ausreichenden Mengen exprimiert wurde, jedoch zu unlöslichen Aggregaten präzipitierte, den sogenannten „inclusion bodies“ (IB). Des Weiteren ist zu vermerken, dass die Aktivität von PlaB durch fusionierte Peptidreste negativ beeinflusst wurde. So zeigten sich sowohl N- als auch C-terminale Fusionen eines His₆-tags, im Vergleich zu analog behandelten Expressionsansätzen von PlaB ohne Fusion, um das 100-fache an lipolytischer Aktivität reduziert. Der Zellaufschluss pelletierter Bakterienkulturen erfolgte entweder durch Lysozym und/oder Sonifizierung oder durch das kommerziell erworbene Extraktionsreagenz ‚BugBuster‘. Dieses besteht aus einem Detergenzmix zur Perforation der Zellwände, ohne jedoch Proteine zu denaturieren. Nach erfolgter Zelllyse zeigte sich, dass nach Bestimmung der Aktivität der Fraktionen, nicht aber nach Detektion mit spezifischen Antikörpern ein gewisser Anteil (ca. 1/4) aktiven PlaBs trotz der IB-Präzipitate auch in löslicher Form vorhanden war. Aus diesem Grund wurde versucht, das Enzym aus der löslichen Fraktion durch Chromatographie anzureichern. Durch die besonders hohe Affinität von GST zu Glutathion-Sepharose lassen sich GST-Fusionsproteine entsprechend gut bis zur Homogenität reinigen.

ERGEBNISSE

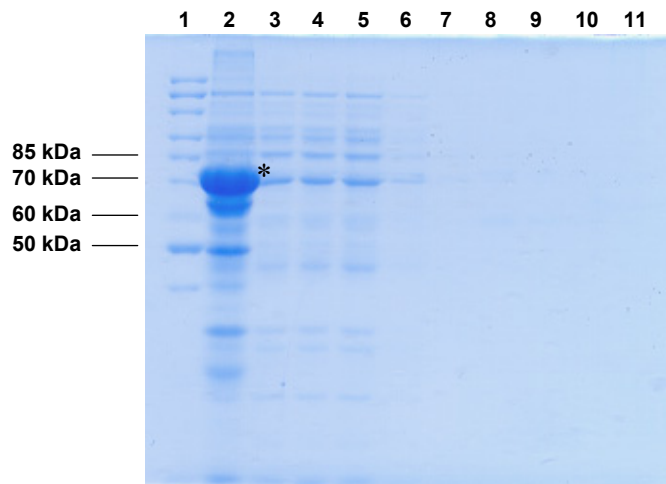


Abbildung 4.12: Reduzierende SDS-PAGE nach Affinitätschromatographie von GST-PlaB.

Der Überstand einer 500ml *E.coli* BL21 (pJB18) Klon 1sk3 Kultur wurde nach Zellaufschluss mit Glutathion-Sepharose Kügelchen versetzt und gebundenes Protein nach erfolgten Waschschritten in 2000-facher Konzentration des ursprünglichen Kulturvolumens eluiert. Spuren: 1: Standard SM#0661; 2: Zellysate nach Zellaufschluss; 3: Überstand nach Zellaufschluss; 4: Durchfluss; 5: Waschen 1; 6: Waschen 2; 7: Waschen 3; 8: Eluat 1; 9: Eluat 2; 10: Eluat 3; 11: Kügelchen. Die Bande des GST-PlaB-Proteins ist mit dem Symbol „*“ gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 4.12 dargestellt, konnte nach Affinitätschromatographie kein PlaB gereinigt und angereichert werden, obwohl das Elutionsvolumen einer 2000-fachen Konzentration des ursprünglichen Kulturvolumens entsprach. Ähnliche Ergebnisse erzielten Reinigungsversuche mit den konstruierten His₆- Fusionen sowohl unter nativen als auch denaturierenden (8M Harnstoff) Bedingungen.

Da durch Affinitätschromatographie kein reines PlaB gewonnen werden konnte, wurde die Reinigung mittels Ionenauschromatographie durchgeführt. Hierzu wurde das Zellpellet einer *E. coli* BL21 (pJB01) Kultur aufgeschlossen, die lösliche Fraktion in 20mM Tris pH 9.2 Laufpuffer auf eine äquilibrierte Anionenausch (AEX)-Q Sepharose FF Säule geladen und mit einem Stufengradienten mit je 10% steigender NaCl-Konzentration eluiert (Abb. 4.13 A). Die gesammelten Fraktionen wurden auf Phospholipaseaktivität untersucht und gereinigte Proteine nach SDS-PAGE mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht (Abb. 4.13 B/C). Wie durch Lipidhydrolyse deutlich gezeigt, eluierte das gut gebundene PlaB nach Zugabe von 30-50% NaCl (Abb. 4.13 B, Fraktionen 21-25 und 28-34). Die entsprechenden Gelspuren der verschiedenen Fraktionen wiesen jedoch keine distinkte Bande um 54 kDa auf (Abb. 4.13 C). Gereinigte Proteine (im Bereich ca. 55 – 80 kDa, markiert mit „*“) wurden mittels Maldi-Tof-Analysen der tryptinverdauten Fragmente eindeutig als *E. coli* Proteine [GroEL, Fr. 32; molekulares Chaperon, Fr. 22; Polyribonukleotid-Nukleotidyltransferase, Fr. 28] identifiziert.

ERGEBNISSE

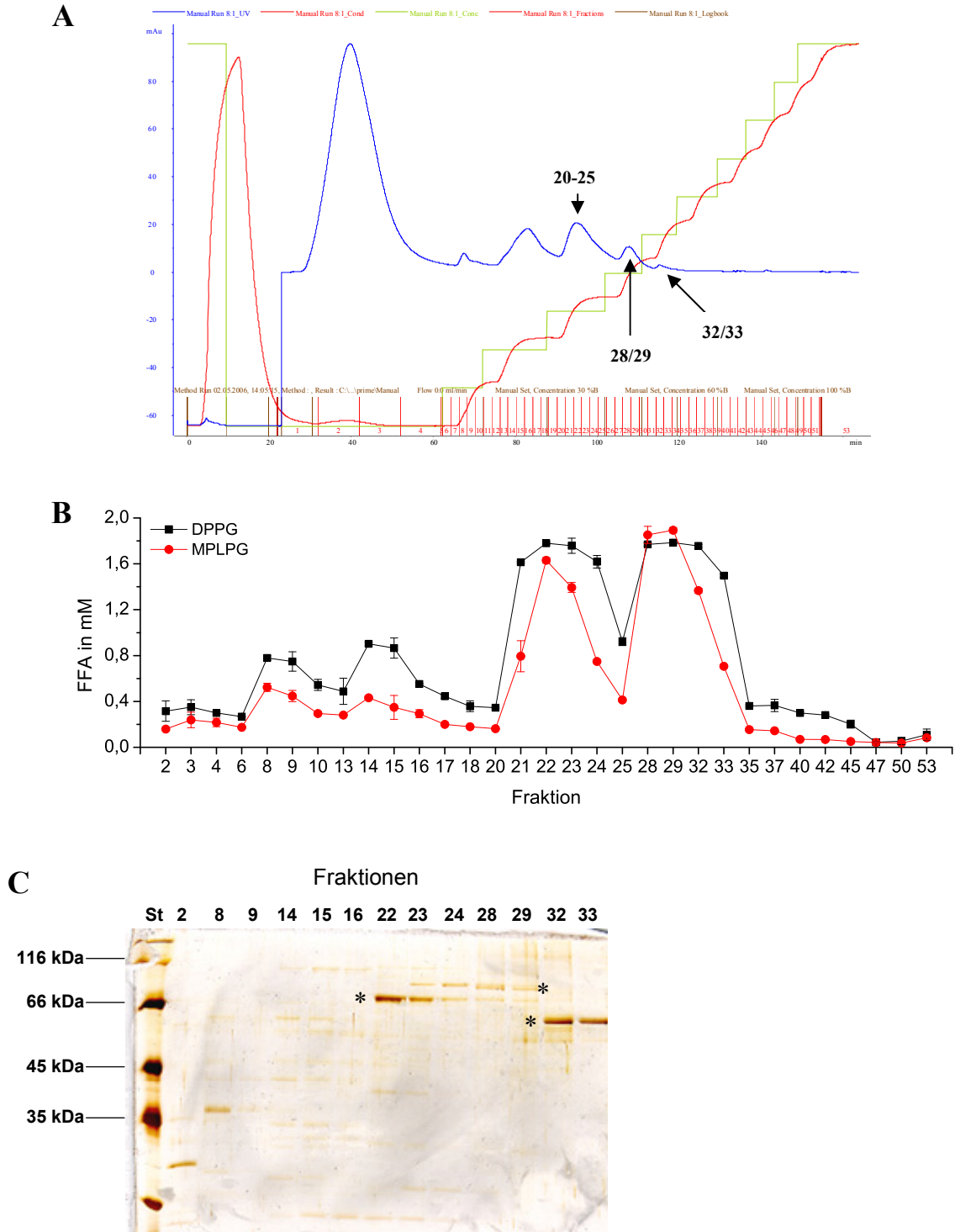


Abbildung 4.13: Reinigung von PlaB mittels Anionentauschchromatographie.

Der Überstand nach Zellaufschluss einer *E. coli* BL21 (pJB01) Klon 1 Überexpression wurde auf eine HiTrap™ 1ml Q FF Säule geladen und mit ansteigender NaCl-Konzentration gebundenes Protein eluiert. A) Chromatogramm des Reinigungsverlaufes von PlaB an der AEX-Säule. B) Gesammelte Fraktionen der Reinigung wurden auf hydrolytische Aktivität gegenüber DPPG und MPLPG untersucht. C) Reduzierende SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung verschiedener Fraktionen der Anionentausch-chromatographie. Mit „*“ markierte Banden wurden als *E. coli* Proteine identifiziert.

Durch weitere Versuche, z. B. durch Absenken des pH-Wertes oder der Intervalle des Stufengradienten konnte PlaB nicht weiter von den anderen Proteinen getrennt werden, noch war es möglich, größere Mengen an PlaB anzureichern.

ERGEBNISSE

Aus diesem Grund wurde nachfolgend eine Vielzahl an Bedingungen getestet, um die Bildung der IBs soweit wie möglich zu unterdrücken. Dies beinhaltete Expressionsbedingungen bei verschiedenen

- Temperaturen (Konstrukte pJB01/pJB02/pJB03/pJB18 bei 37°C; Konstrukt pJB18 bei 30°C, 20°C und 16°C im Zusammenhang mit *E. coli* XA90 Zellen),
- Induktionszeiten (Konstrukte pJB01/pJB02/pJB03/pJB18 für 4h bei 37°C oder Konstrukt pJB18 über Nacht bei niedrigeren Temperaturen) und
- Induktionskonzentrationen (IPTG 0,01 – 1mM für pET- oder pGEX-basierende Vektoren pJB01/pJB03/pJB18; 0,0002 – 0,2% Arabinose für den pBAD-basierenden Vektor pJB02).

Durch die erwähnten Bedingungen konnte keine verbesserte Löslichkeit von PlaB erreicht werden. Daher mussten im nächsten Schritt verschiedene Möglichkeiten zur Solubilisierung des präzipitierten GST-fusionierten PlaB gefunden werden.

Verwendete Reagenzien beinhalteten:

- 0,5% Nonidet P-40
- 0,5% Natriumdeoxycholat
- 10% Glycerol
- 0,5% Triton X-100
- 6.7mM DPPC/DPPG/MPLPC und MPLPG (ohne 0,1% Triton X-100)
- 6.7mM MPLPG (mit 0,1% Triton X-100).

Die Inkubation erfolgte sowohl bei 37°C, RT oder 4°C. Abbildung 4.14 zeigt einen anti-GST-detektierten Westernblot der Solubilisierungsversuche mit Nonidet, Natriumdeoxycholat und Triton X-100. Keines der Detergenzien konnte PlaB aus den IBs herauslösen, denn PlaB assoziierte noch immer mit der unlöslichen Pelletfraktion.

Der Western Blot deutete 2 weitere Banden unterhalb von PlaB an (Abb. 4.14, ca. 60 und 40kDa). Da sich der GST-tag am N-Terminus von PlaB befindet, weisen die zusätzlichen Banden auf eine C-terminale Degradation von PlaB in *E. coli* hin.

ERGEBNISSE

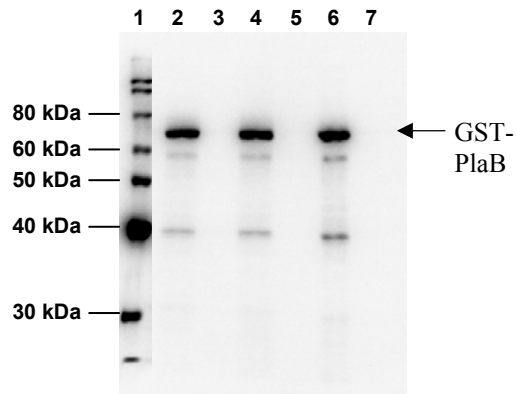


Abbildung 4.14: Anti-GST Western Blot der PlaB-Solubilisierungsversuche.

Nach Zelllyse von GST-*plaB* exprimierenden *E. coli* BL21 (pJB18) Klon 1sk3 Zellen wurde der Versuch unternommen mit den Reagenzien Natriumdeoxycholat, Triton X-100 und Nonidet P-40 PlaB aus den ‚*inclusion bodies*‘ zu solubilisieren. Die Solubilisierungsansätze wurden für ~60h bei 4°C inkubiert. Danach wurden Pellet- und Überstandsfractionen durch Zentrifugation getrennt und in gleichen Mengen auf das SDS-Gel aufgetragen. Spuren: 1: Standard MagicMark; 2/3: Pellet bzw. Überstand nach Natriumdeoxycholat-Inkubation; 4/5: Pellet bzw. Überstand nach Nonidet P-40-Inkubation; 6/7: Pellet bzw. Überstand nach Triton X-100-Inkubation.

Da beschriebene Agenzien PlaB nicht solubilisieren konnten, wurde im letzten Schritt die Denaturierung und anschließende Rückfaltung des Enzyms untersucht. Denaturierungsmittel beinhalteten:

- 0,2 SDS
- 2, 4, 6 und 8M Harnstoff
- 6M Guanidinhydrochlorid (GuHCl).

Alle Reagenzien führten zu totalem Aktivitätsverlust von PlaB. Nur 8M Harnstoff- oder 6M GuHCl-Puffersysteme lösten das Protein zu großen Teilen aus den IBs. Da die Rückfaltung aus 8M Harnstofflösungen durch Dialyse zum Präzipitieren des Proteins führte, wurde versucht, PlaB mittels Verdünnungsmethodik und mit Hilfe des „*Pro-Matrix Protein Refolding Kit*“ (Pierce) rückzufalten. Hierzu wurden gereinigte „*inclusion bodies*“, bestehend aus PlaB ohne Peptidfusionen, mit 6M GuHCl in 50mM Tris solubilisiert. Neben den empfohlenen Konditionen, z. B. verschiedenen Proteinmengen, Temperaturen, Redox-Umgebung, Disulfidstatus, Polyethylenglycol und divalenten Kationen, wurde auch der Einfluß von 3mM MPLPC + 0,2% Triton X-100 auf die Rückfaltung von PlaB ermittelt. Wie sich in anschließenden Lipidhydrolyseansätzen herausstellte, konnte keine der Bedingungen, ausgehend von 6M GuHCl oder auch durch 8M Harnstoff denaturiertem PlaB, das Enzym zu seiner nativen bzw. aktiven Konformation zurückbringen.

Da alle erwähnten Versuche nicht zu einer erfolgreichen Reinigung von aktivem PlaB aus *E. coli* führten, sollten im Folgenden weitere Expressionsmodelle getestet werden.

4.1.5.3. Expression in *P. pastoris*

Als neuer Expressionswirt wurden Hefezellen der Gattung *P. pastoris* aus dem „*Pichia Expression Kit*“ (Invitrogen) verwendet. *P. pastoris* ist eine methylotrophe Hefe und kann Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle verwerten. Die Alkoholoxidase, kodiert von den Genen *AOX1* und *AOX2*, ist das erste Enzym im Methanolmetabolismus und steht unter einem sehr starken, methanol-induzierbaren Promotor. Die zu exprimierenden Gene werden unter die Kontrolle des *AOX1*-Promotors gestellt und stabil in das Genom der Hefen integriert. Hierbei kann das Protein entweder mit einem Signalpeptid zur extrazellulären Sekretion ausgestattet oder ohne Fusionspeptid intrazellulär exprimiert werden. Das *plaB*-Gen wurde sowohl in das Plasmid für die sekretierte Form (pPIC9) als auch in das Plasmid für die intrazelluläre Variante (pPIC3.5) eingebracht. Die resultierenden Vektoren pJB15 und pJB14 wurden in je zwei verschiedene *P. pastoris* Stämme (s. Material und Methoden) elektroporiert.

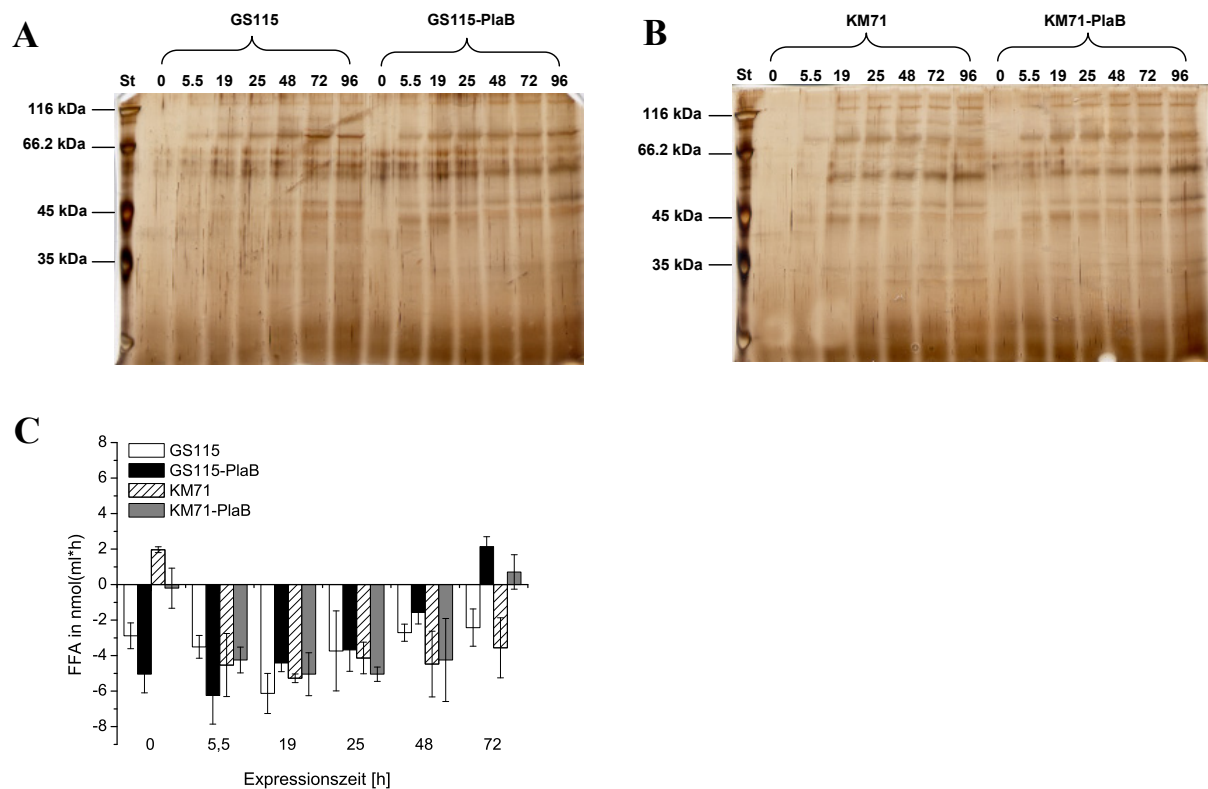


Abbildung 4.15: Expression von *plaB* in *P. pastoris*.

Das Sekretom der *plaB*-Expression in den Integrationsstämmen Pp01 Klon1 (GS115-*plaB*) und Pp02 Klon2 (KM71-*plaB*) ist im Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen mittels reduzierender SDS-PAGE und Silberfärbung dargestellt (A+B). Die Expression wurde über einen Zeitraum von 0 - 96h verfolgt. C) Hydrolytische Aktivitäten der korrespondierenden Kulturüberstände gegenüber dem Phospholipid DPPG. Die Bestimmung freier Fettsäuren erfolgte nach einer Inkubationszeit von 19h bei 37°C.

Eine stabile Integration von *plaB* in den Locus der Histidinoldehydrogenase wurde mittels PCR mit chromosomaler DNA verifiziert und die *plaB* Expression verschiedener Klone über

einen Zeitraum von 96h dokumentiert. Analysen des Sekretoms mit Hilfe von reduzierender SDS-PAGE (Abb. 4.15 A/B/) und Lipidhydrolyse (Abb. 4.15 C) zeigten, dass PlaB unter diesen Bedingungen nicht ausreichend sekretiert wurde. Eine Exzision des *plaB* Gens aus dem Hefegenom konnte durch PCR bei allen Zeitpunkten ausgeschlossen werden (nicht gezeigt). Sowohl weitere Klone als auch die Konstrukte der intrazellulären Expression führten nicht zu einer erfolgreichen Überexpression von *plaB* und wurden daher nicht weiter zur Reinigung herangezogen.

4.1.5.4. *In vitro* Translation und Transfektion

Ein weiterer Versuch zur *plaB* Expression und anschließender Reinigung wurde mit den Systemen der *in vitro* Translation und der Transfektion von humanen Lungenepithelzellen unternommen.

Für die *in vitro* Translation wurden 2 verschiedene Kits verwendet. Das T7 System der Firma Promega basiert auf Zellextrakten unterschiedlicher Herkunft, so z. B. Retikulozytenextrakt aus Kaninchen, Weizenkeimextrakt oder Zelllysate von *E. coli* T7 S30. Die *in vitro* Translationen wurden nach den Angaben des Herstellers und mit unterschiedlichen *plaB*-exprimierenden Vektoren durchgeführt. Für den *E. coli* Extrakt konnten sowohl His-/GST- als auch Flag-PlaB-Fusionsvektoren (pJB03, pJB18 und pJB43) verwendet werden. Die Retikulozyten- und Weizenkeimextrakte waren auf das Vorhandensein eines T7 Promotors angewiesen und konnten daher nur im Zusammenhang mit den Vektoren pJB18 (GST-PlaB) und pJB43 (Flag-PlaB) getestet werden. In keinem dieser Fälle, überprüft durch Western Blot mit entsprechenden Antikörpern und mittels Lipidhydrolyse, konnte eine Expression von *plaB* nachgewiesen werden. Verwendete Vektoren zeigten jedoch geringe Abweichungen zu den vom Hersteller unterstützten Anforderungen, so sollte die Shine Dalgarno Sequenz (in *E. coli*: -AGGAGGA-) nur 6-8 Nukleotide vom Translationsstart entfernt liegen. Daher wurde ein neuer Vektor konstruiert, der dieser Anforderung entsprach. Das *plaB*-Gen wurde hierfür in pET-21b (resultierendes Protein trägt keinen tag) kloniert, mit einem Abstand der Shine Dalgarno Sequenz und des Translationsstartes von 7 Nukleotiden. Der resultierende Vektor pJB46 wurde nach überprüfter und erfolgreicher Expression in *E. coli* BL21 mit einem zweiten *in vitro* Translationskit weiteren Expressionsstudien unterzogen. Im Gegensatz zu dem Kit der Firma Promega beruht der PURExpress Kit (NEB) auf zellfreier Proteinsynthese durch rekombinant hergestellte His-Fusionsproteine des Transkriptions- und Translationsapparates. Dies ist vor allem für eine anschließende inverse Reinigung von Vorteil, da die Proteine des Expressionssystems an eine Matrix gebunden werden können, das

ERGEBNISSE

gesuchte Protein aber in Lösung verbleibt. Jedoch konnte auch durch dieses System keine Expression von *plaB* bewirkt werden, wie sich durch Aktivitätstests eindeutig belegen ließ (nicht gezeigt).

Ein letzter Versuch, PlaB in Reinform zu erhalten, wurde durch Transfektion von Zellkultursystemen, in diesem Fall A549 Lungenepithelzellen, unternommen. Hierzu wurde *plaB* in den eukaryonten Transfektionsvektor pcDNA3.1(+)-Flag kloniert. Der auf pcDNA3.1(+) – basierende Vektor trägt einen Flag-tag-Linker, welcher über die Schnittstellen ApaI und XbaI eingefügt wurde und die Reinigung und Detektion des Zielproteins erleichtern sollte. METAFECTENE (Biontex), ein polykationisches Transfektionsreagenz in liposomaler Form, wurde zur Etablierung der Transfektion von A549 Zellen eingesetzt. Abbildung 4.16 zeigt unterschiedliche Mengen an transfiziertem Vektor pJB43 im Vergleich zu pEGFP-C2 Kontrolltransfektionen und Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz (TR) behandelt wurden. Letztere waren nach 24h Inkubation noch vital, wo hingegen Plasmidmengen ab ~500ng toxisch für A549 Zellen waren. Das zeigte sich unabhängig von verwendeten Plasmiden oder zu exprimierenden Genen, da der pEGFP-C2 Vektor ebenso wie der *plaB*-exprimierende Vektor pJB43 zum Abrunden der Zellen und Abkapseln von apoptotischen Körperchen führte (Abb. 4.16).

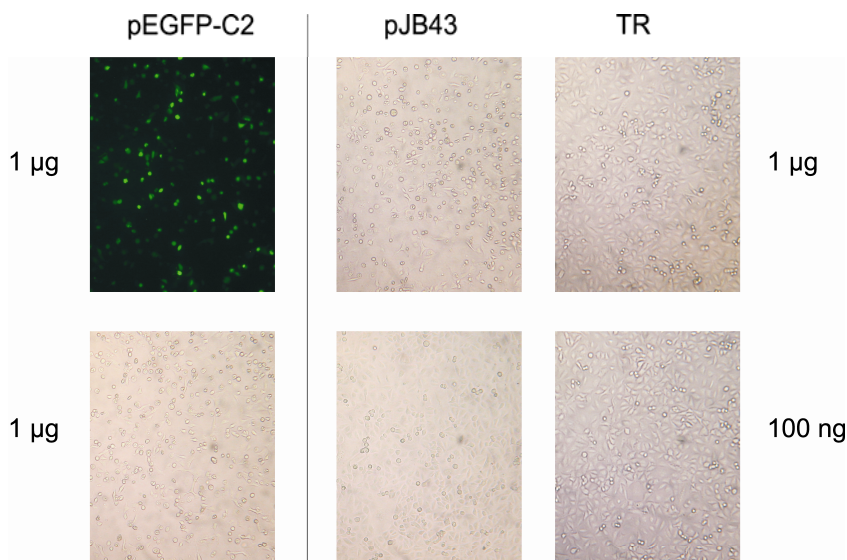


Abbildung 4.16: Etablierung der Transfektion von A549 Lungenepithelzellen mit dem *plaB*-exprimierenden Plasmid pJB43 Klon 2.

Ein optisch konfluenter Rasen von A549 Zellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen eines *plaB*-exprimierenden Plasmids (pJB43 Klon 2) transfiziert. Zum Vergleich dienten Zellen, die nur mit Transfektionsreagenz (TR) behandelt und Ansätze, die mit 1µg des Kontrollvektors pEGFP-C2 transfiziert wurden. Die Zellen wurden nach 24h Inkubation mikroskopisch untersucht und auf ihre Transfektionseffizienz durch Bestimmung der GFP-Fluoreszenz überprüft. Die Aufnahmen sind repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente.

ERGEBNISSE

Zusätzlich konnte eine Überproduktion und damit eine erhöhte Phospholipaseaktivität von PlaB als Grund für den Abfall an Zellviabilität ausgeschlossen werden, da sich sowohl die Membranzusammensetzung der *plaB*-transfizierten Zellen, als auch die Freisetzung von Fettsäuren in der Zellkulturüberstand nicht von den leervektortragenden Zellen unterschied (nicht gezeigt). Bei einer Transfektionseffizienz von durchschnittlich ~40% konnte in nachfolgenden Western Blot Analysen nur GFP-Expression, nicht aber die von Flag-PlaB nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Ob *plaB* überhaupt nach erfolgter Transfektion exprimiert wurde, konnte mit reverser Transkription von RNA ermittelt und durch Lipidhydrolyse verifiziert werden. Wie sich am RNA-Level im Vergleich zu der endogenen Kontrolle β -Aktin zeigte, wurde die transfizierte *plaB*-DNA gut transkribiert (Abb. 4.17).

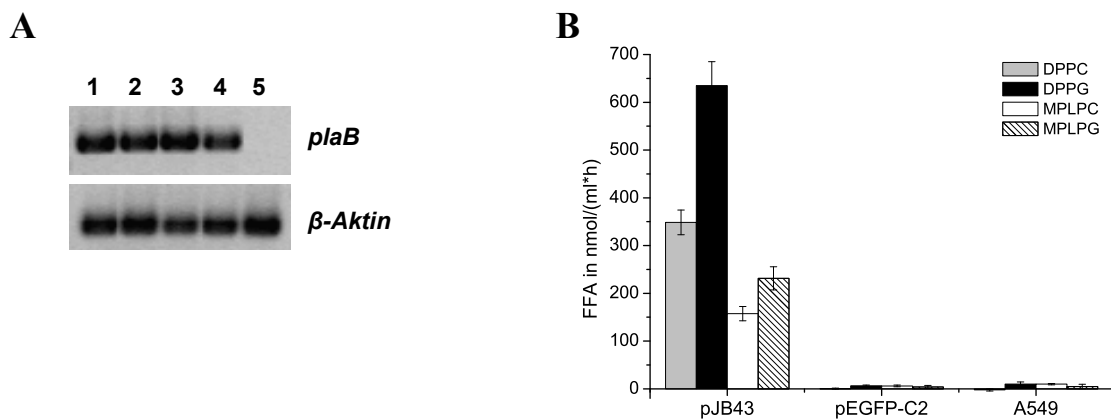


Abbildung 4.17: Expression von *plaB* in transfizierten A549 Lungenepithelzellen.

Der *plaB*-exprimierende Vektor pJB43, wie auch der Kontrollvektor pEGFP-C2 wurden in A549 Lungenepithelzellen transfiziert und sowohl die Expression des *plaB*-Gens (A) als auch die Aktivität (B) des PlaB-Enzyms nachgewiesen. A) RT-PCR der *plaB*- und, als Kontrolle, der β -Aktin-Expression. Spuren 1/2: 1 μ g bzw. 500ng pJB43 Transfektion nach 24h; 3/4: 1 μ g bzw. 500ng pJB43 Transfektion nach 48h; 5: 500ng pEGFP-C2 Transfektion nach 24h. B) Lipidhydrolyse transfizierter A549 Zellen. Der Vektor pJB43 trägt das *plaB*-Gen, welches innerhalb von 20h Transfektionszeit in aktives Protein umgesetzt werden konnte. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

Es konnten *plaB*-Transkripte sowohl nach 24h als auch nach 48h nachgewiesen werden (Abb. 4.17 Spuren 1/2 bzw. 3/4). Alle Ansätze waren frei von DNA-Kontaminationen. Zellaufschluß und Lipidhydrolyse eines weiteren Transfektionsversuches zeigten, dass auch PlaB als aktives Protein translatiert wurde (Abb. 4.17 B). Da die Aktivität jedoch sehr gering war, wird vermutlich nicht genügend *plaB* exprimiert, um im Western Blot detektiert werden zu können. Nachfolgende Erhöhung der Anzahl an Lungenepithelzellen brachte nicht mehr Ausbeute an PlaB. Daher wurde die angestrebte Reinigung des Enzyms aus A549-Zellkultur an dieser Stelle abgebrochen.

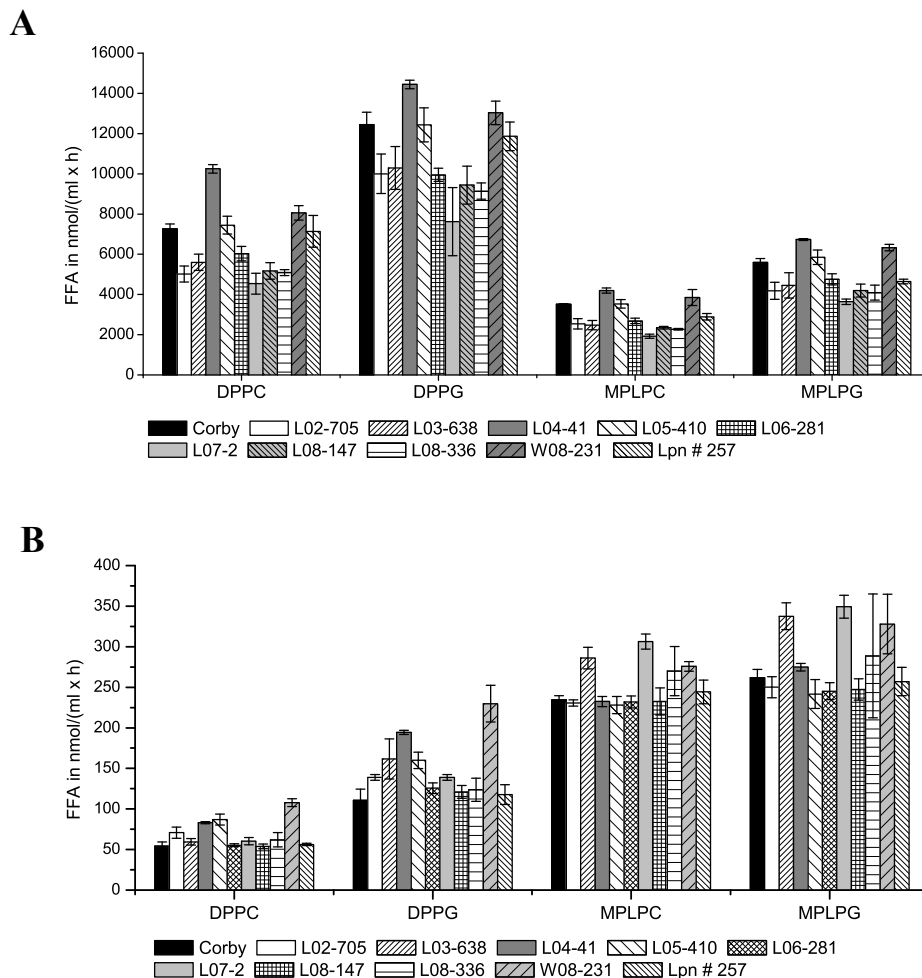
Alles in allem konnte PlaB unter verschiedensten Bedingungen und einer Vielzahl an Systemen nicht als funktionelles Enzym gereinigt werden.

4.2. Verbreitung von PlaB

Alle vier bisher sequenzierten Genome von *L. pneumophila* (Lens, Paris, Philadelphia-1 und Corby) sowie der Stamm 130b kodieren für das *plaB*-Gen. Es war nun im Folgenden von Interesse, ob die zell-assoziierte Aktivität auch noch in weiteren Stämmen gefunden werden kann. Neben klinischen Isolaten wurden auch Legionellenspezies untersucht, welche nicht zu der Gruppe *L. pneumophila*, dem hauptsächlichen Erreger der Legionellose, gehören.

4.2.1. Lipolytische Aktivität klinischer Isolate von *L. pneumophila*

Wie sich im Tiermodell zeigte, ist PlaB von Vorteil für das Infektionspotential von *L. pneumophila* (s. 4.3.5.1). Ob sich Ähnliches auch im Zusammenhang mit Humaninfektionen bestätigt, kann durch eine Überprüfung vorhandener *plaB*-Gene und/oder zell-assoziiierter Aktivität klinischer Isolate getestet werden. Zelllysate und korrespondierende Kulturüberstände von neun klinischen *L. pneumophila* Isolaten unterschiedlicher Serogruppen wurden daher auf ihre Fähigkeit hin überprüft, Phospholipide und Lysophospholipide zu hydrolysieren.



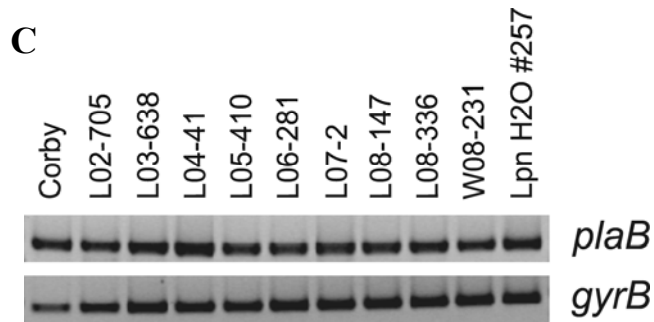


Abbildung 4.18: Lipidhydrolyse klinischer Isolate und eines Umweltisolates von *L. pneumophila* und Expression von *plaB*-ähnlichen Genen.

Zelllysate (A) und Kulturüberstände (B) der klinischen Isolate von *L. pneumophila* und eines Umweltisolates Lpn # 257 wurden mit Phospholipiden und Lysophospholipiden inkubiert und die Freisetzung von Fettsäuren bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von 2 unabhängigen Experimenten. C) RT-PCR zur Überprüfung der *plaB* Expression der klinischen Isolate und des Umweltisolates im Vergleich zur endogenen Kontrolle *gyrB* (Untereinheit B der Gyrase).

Alle klinischen Isolate und ein Umweltisolat (Lpn #257) zeigten eine vergleichbare zell-assoziierte Aktivität zu der des Referenzstammes *L. pneumophila* Corby (Abb. 4.18 A/B). Die Aktivitätsschwankungen zwischen den Isolaten sind nicht als gravierend einzustufen, da auch die Stämme Corby und 130b oder Philadelphia-1 die Lipide mit unterschiedlicher Intensität spalten (nicht gezeigt). Hierzu ist anzumerken, dass die Enzyme verschiedener sequenzierter *L. pneumophila* Stämme eine sehr hohe Homologie und Identität untereinander aufweisen. So zeigen z. B. die Proteine Corby PlaB und PlaB des Stammes Paris eine Homologie und Identität von 99%. Das die detektierte zell-assoziierte Aktivität der klinischen Isolate von PlaB-ähnlichen Enzymen her resultiert, konnte in RT-PCR Analysen weiter untermauert werden. Alle in der Lipidhydrolyse getesteten Stämme zeigten ein Amplifikat mit *plaB*-spezifischen Primern auf Höhe der Wildtypbande (Abb. 4.18 C). DNA-Kontaminationen konnten ausgeschlossen werden. Interessanterweise ist ein *L. pneumophila* Stamm (Lpn #257), isoliert aus einem Wasserleitungssystem, gleichermaßen in der Lage, Lipide zu spalten, und transkribiert ein *plaB*-Gen analog zu den klinischen Isolaten und dem Referenzstamm *L. pneumophila* Corby (Abb. 4.18 A-C).

4.2.2. Vorkommen von PlaB-Enzymen in nicht-*pneumophila* Legionellenstämmen

Gegenwärtig wurden mindestens 50 verschiedene *Legionella*-Spezies beschrieben, von denen 19 bisher als humanpathogen auffällig identifiziert werden konnten (zusammengefasst von Muder und Yu (187)). Mit einem prozentualen Anteil von über 90% stellt *L. pneumophila* den häufigsten Erreger einer Legionelleninfektion dar, gefolgt von *L. longbeachaea* (3,9%) und *L. bozemanii* (2,4%) (308). Das allgemeine Interesse, unter anderem für Therapieansätze,

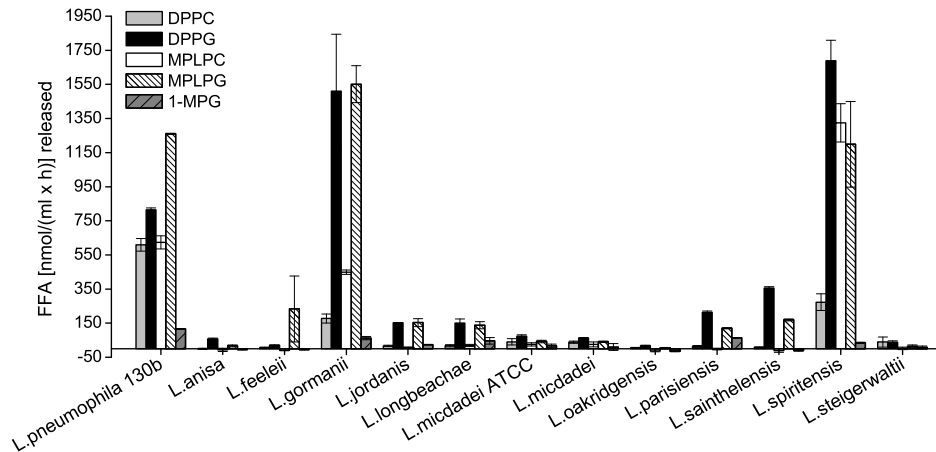


Abbildung 4.19: Zell-assoziierte Lipidhydrolyse von nicht-*pneumophila* Legionellen im Vergleich zu *L. pneumophila* 130b.

Die angegebenen Stämme wurden bis zu einer OD₆₆₀ von 1,5 angezogen, sedimentiert und die Freisetzung von Fettsäuren durch lipolytische Aktivität der Zellpellets bestimmt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (Rydzewski und Flieger in Bender *et al.* 2009).

besteht vornehmlich in der Identifizierung von Virulenzfaktoren, die ausschließlich in pathogenen Spezies vorhanden sind. Daher wurde untersucht, ob auch nicht-*pneumophila* Stämme für PlaB-Enzyme kodieren und diese aktiv exprimieren. Wie in Abbildung 4.19 gezeigt, wiesen vor allem *L. gormanii* und *L. spiritensis* eine vergleichbare zell-assoziierte Hydrolysestärke zu *L. pneumophila* 130b auf (23). Mit ansteigender Inkubationszeit war bei den Spezies *L. anisa*, *L. jordanis*, *L. parisiensis* und *L. sainthelensis* quantitativ geringere zell-assoziierte Aktivität messbar. Interessanterweise waren alle nicht-*pneumophila* Stämme in ihrer Fähigkeit, cholinhaltige Lipidsubstrate wie z. B. DPPC zu spalten, reduziert (Abb. 4.19).

Die Möglichkeit der lipidspezifischen Lipolyse von Phosphatidylcholin scheint *L. pneumophila* Stämmen vorbehalten zu sein, da sowohl Stamm Corby als auch die Stämme 130b und Philadelphia-1 starke Aktivität gegenüber diesen Lipiden besitzen (nicht gezeigt).

4.2.2.1. *plaB*-Gene im Genom von *L. gormanii* und *L. spiritensis*

Da unter den nicht-*pneumophila* Stämmen besonders *L. gormanii* und *L. spiritensis* in der Lage waren, Lipide durch zell-assoziierte Aktivitäten zu spalten, sollte im Weiteren entschlüsselt werden, ob tatsächlich PlaB-ähnliche Proteine für diese Aktivität verantwortlich sind. Daher wurde eine Zusammenstellung an Oligonukleotiden, ursprünglich für die Amplifikation von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *plaB* entworfen, für den Nachweis der *plaB*-Genpräsenz in den nicht-*pneumophila* Stämmen verwendet. Durch PCR konnte ein Vollängentranskript aus *L. spiritensis* amplifiziert werden. Von *L. gormanii* wurde nur eine verkürzte Version erhalten (23). Beide Fragmente wurden sequenziert und auf ihre

Homologie zu *L. pneumophila* *plaB* bzw. PlaB überprüft. Das Gen für *L. spiritensis* *plaB* (Genbank Zugangsnummer EF408871) zeigte 86% Identität, das korrespondierende Protein 88% Identität und 94% Homologie zu *L. pneumophila* Corby *plaB* und PlaB. Die verkürzte Version aus *L. gormanii* wies ebenso eine Proteinidentität und Homologie von 86% und 95% zu *L. pneumophila* Corby PlaB auf (Aminosäuren 16-256). Wie schon in sequenzvergleichender Analyse für *L. spiritensis* gezeigt (Abb. 4.6), besitzt auch *L. gormanii* PlaB die hydrolytisch essentiellen Aminosäuren Ser-Asp-His der katalytischen Triade sowie Ser-129, eine Aminosäure, wichtig für die Substratspezifität von *L. pneumophila* Corby PlaB.

4.2.2.2. Lipolytische und hämolytische Aktivität von *L. spiritensis* PlaB

Das Gen von *L. spiritensis* *plaB* wurde für weiterführende Experimente in den Vektor pBCKS kloniert und im Vergleich zu *L. pneumophila* Corby *plaB* in *E. coli* DH5 α exprimiert. Hierbei bestätigte sich, dass *L. spiritensis* PlaB gegenüber *L. pneumophila* PlaB um einen Faktor von 2.5 in der Fähigkeit reduziert war, Phosphatidylcholin zu hydrolysieren (Abb. 4.20 A).

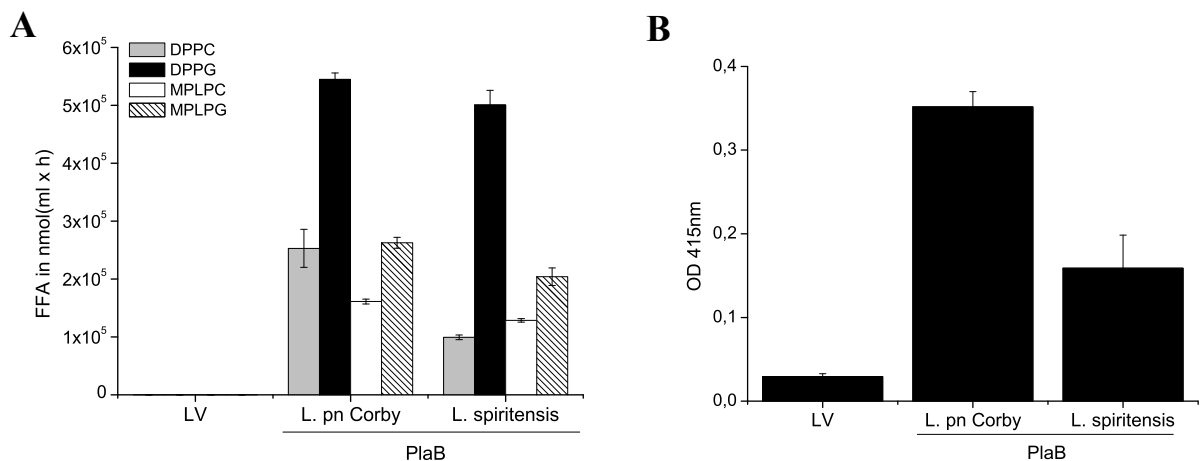


Abbildung 4.20: Lipidhydrolyse- und Hämolyseigenschaften von *L. spiritensis* PlaB.

L. spiritensis *plaB* wurde im Vergleich zu *L. pneumophila* *plaB* in *E. coli* DH5 α Zellen exprimiert und die Zelllysate auf ihre Eigenschaft hin untersucht Phospholipide und Lysophospholipide zu spalten (A). Die verringerte DPPC Hydrolyse konnte nach Kalkulation dreier unabhängiger Experimente als signifikant ($p < 0,05$) eingestuft werden. Um die Zytotoxizität der transformierten *E. coli* DH5 α zu bestimmen wurden die Bakterien mit humanen roten Blutzellen inkubiert und die Freisetzung von Hämoglobin in der Überstand gemessen (B). Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. LV= Leervektor pBCKS.

Dieser Defekt spiegelte sich in nachfolgenden Hämolysestudien wider. Auch hier zeigte *L. spiritensis* PlaB im Vergleich zu *L. pneumophila* PlaB ein 2.2-fach niedrigeres Lysepotential zur Freisetzung von Hämoglobin in den Überstand der Erythrozyten-Bakterien-Suspension (Abb. 4.20 B).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass *plaB* nicht restriktiv von *L. pneumophila* kodiert und zu einem aktiven Protein translatiert wird. Jedoch weisen die nicht-*pneumophila* PlaBs reduzierte

Aktivität gegenüber Phosphatidylcholin, dem Hauptbestandteil der äußeren Lipidschicht von eukaryotischen Zellmembranen, auf (73).

4.3. Funktionelle Analyse von PlaB

Im vorherigen Abschnitt konnte mittels biochemischer Charakterisierung von PlaB gezeigt werden, dass das Enzym eine neue Klasse von lipolytischen Enzymen repräsentiert. Bisher ist jedoch, zusätzlich zu den lipolytischen und hämolytischen Aktivitäten, weder etwas über die Funktion von PlaB noch über die der PlaB-Homologe bekannt. Phospholipasen und auch Lysophospholipasen können herausragende Rollen während eines Infektionsprozesses übernehmen. So tragen sie z. B. zu der Etablierung der replikativen Nische (SseJ, *Salmonella*; PLC A-D, *Mycobacterium*), der Zytotoxizität gegenüber der Wirtszelle (α -toxin, *Clostridium*) oder der Stimulierung/Blockierung des Immunsystems (ExoU, *Pseudomonas*; β -toxin, *Staphylococcus*) bei (s. Einleitung). Erste Versuche zum Einfluss von PlaB auf die Virulenz von *L. pneumophila* in Zellkulturinfektionen von *Acanthamoeba castellanii* Amöben oder U937 Makrophagen zeigten keine Reduktion des Replikationspotentials von *plaB* Mutanten im Vergleich zu den Wildtypstämmen Corby und 130b (94). Wie jedoch mittels Lipidhydrolyse von *L. pneumophila* infizierten U937 und Amöben demonstriert werden konnte, stellt PlaB die höchste phospholipolytische Aktivität während einer Infektion dar (s. 4.3.4, (23). Expressionsstudien zeigten, dass *plaB*, im Gegensatz zu vielen Virulenzfaktoren der transmissiven Phase, während einer Amöbeninfektion eher konstitutiv exprimiert wird (42). Vergleicht man das mRNA Level 8h und 14h post Infektion, steigt das Transkriptionslevel nur um einen Faktor von 1.48 an. *In vitro* Untersuchungen demonstrierten zudem, dass das maximale Level an mRNA von *plaB* während der exponentiellen Wachstumsphase in BYE-Bouillon zu finden ist, das Aktivitätsmaximum des Enzyms sich aber vielmehr in die postexponentielle Replikationsphase verschiebt (247). Da PlaB die höchste Aktivität unter allen Phospholipasen von *Legionella pneumophila* einnimmt, ist eine zufällige Akquirierung des Gens unwahrscheinlich. Folgende Untersuchungen liefern erste Ergebnisse in der schrittweisen Entschlüsselung der Funktion und Bedeutung von PlaB für *L. pneumophila*.

4.3.1. Beeinflussung der Viabilität von *L. pneumophila* durch PlaB-Aktivität

Lokalisationsstudien von PlaB weisen auf eine starke Assoziation des Enzyms mit der äußeren Membran von Legionellen hin (247). Da PlaB im Gegensatz zu den bisher identifizierten GDSE-Enzymen und Patatin-ähnlichen Phospholipasen A nicht in den

ERGEBNISSE

Kulturüberstand sekretiert oder direkt in die Wirtszelle injiziert wird (13,287), könnte das Enzym im Verlauf des Lebenszyklus' neben dem Einfluss auf die Zielzelle auch die Viabilität der Bakterien beeinflussen. Studien zu OMPLA von *H. pylori* zeigen, dass die Aktivität dieses Enzyms die Etablierung der replikativen Nische im sauren Milieu des Magens unterstützt ((272), s. Einleitung). Dies geschieht durch reversible Veränderung des Lysophospholipidanteils der *Helicobacter*-Membran. Aus diesem Grund wurden *L. pneumophila* Wildtyp Corby bzw. 130b und die entsprechenden *plaB* Mutanten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen angezogen und insbesondere bei abweichendem Wuchs die Lipidzusammensetzung der bakteriellen Membranen untersucht.

Zuerst wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf das Wachstumsverhalten des Wildtypes und der *plaB* Mutante dokumentiert. Temperaturveränderungen spielen bei Legionellen im Zusammenhang mit Motilität, Piliation und Virulenz eine große Rolle (167,176,200).

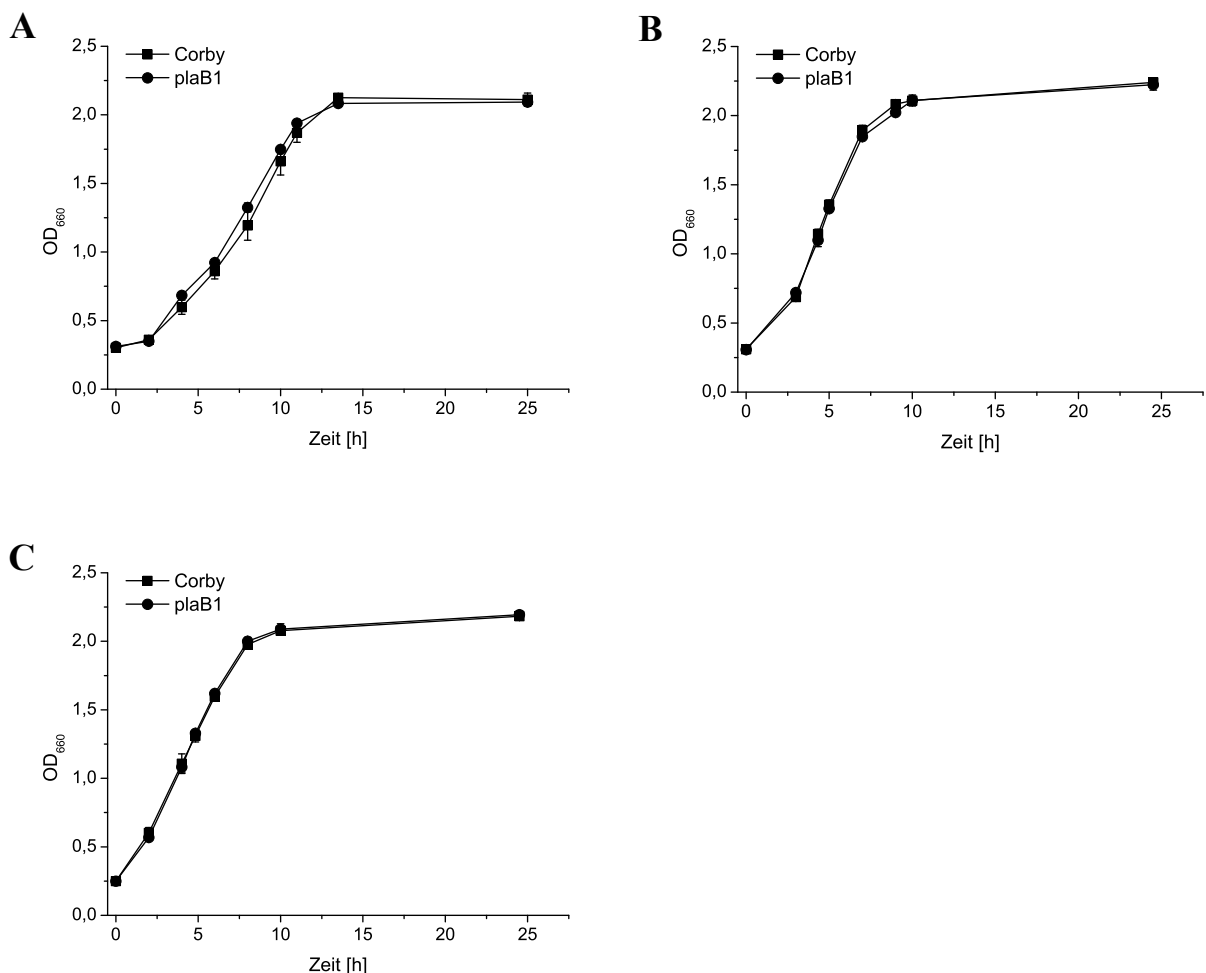


Abbildung 4.21: Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* Corby Wildtyp und *plaB* Mutante bei verschiedenen Temperaturen.

Die Bakterien wurden in BYE-Bouillon bei 30°C (A), 37°C (B) und 40°C (C) über einen Zeitraum von ~24h geschüttelt und die optische Dichte der Kulturen bei OD₆₆₀ bestimmt. Die Daten stehen vor Doppelwerte von 2 unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Die Wuchsexperimente zeigten jedoch, dass sowohl niedrigere Temperaturen (30°C) als auch Körpertemperatur (37°C) oder leicht erhöhte Gradzahl (40°C) keinen Einfluss auf die PlaB-abhängige Replikation von Legionellen in BYE-Bouillon haben (Abb. 4.21 A/B/C). Das schließt eine Veränderung der Membranzusammensetzung in Abhängigkeit von PlaB allerdings nicht aus. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe der Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) genauer bearbeitet. Hierzu wurde eine Legionellensuspension nach Anzucht bei 37°C in einem Frequenzbereich von 2825 – 2956 cm⁻¹ vermessen, welcher die Region der Fettsäure-Streckschwingung, allgemein die der symmetrischen und asymmetrischen CH₂- bzw. CH₃-Streckschwingung, widerspiegelt. Zusätzlich wurde der Bereich der zugehörigen Deformationsschwingung (1400 – 1500 cm⁻¹ untersucht [nicht gezeigt]). Hierbei konnte kein Unterschied zwischen den Spektren der Wildtypmembranen und der der *plaB* Mutante festgestellt werden (Abb. 4.22). Die Ergebnisse verifizieren die Annahme, dass PlaB unter Standard-Wuchsbedingungen keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien und Lipidzusammensetzung der Legionellenmembran hat. Weitere FT-IR spektroskopische Untersuchungen von 48h – 144h Legionellenanzucht auf Platte oder in Flüssigkultur zeigten ebenfalls keinen Unterschied im Lipidspektrum der beiden Stämme.

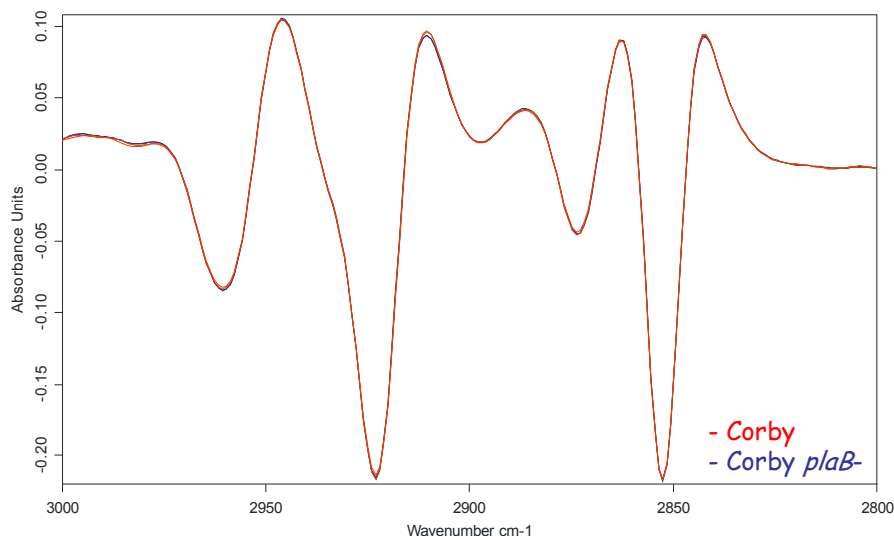


Abbildung 4.22: FT-IR Spektroskopie der Legionellenmembran.

L. pneumophila Wildtyp Corby und die *plaB* Mutante wurden für 120h bei 37°C auf BCYE-Agarplatten inkubiert. Die Zusammensetzung der bakteriellen Membran wurde im Frequenzbereich der C-H-Streckschwingung (2825 – 2956 cm⁻¹) analysiert. Das Spektrum repräsentiert eines von 3 unabhängigen Experimenten.

Interessanterweise akkumulierte die *plaB* Mutante bei 72h Inkubation auf Platte das Speicherlipid Polyhydroxybutyrat (PHB, Frequenzbereich 1741 cm⁻¹, nicht gezeigt). Die reduzierte Fähigkeit, PHB zu spalten, konnte jedoch nicht durch das Einbringen eines *plaB*-exprimierenden Plasmides komplementiert werden und bleibt deshalb fragwürdig.

ERGEBNISSE

Das Wuchsverhalten von Wildtyp und *plaB* Mutante verhielt sich bei veränderten pH-Bedingungen unterschiedlich.

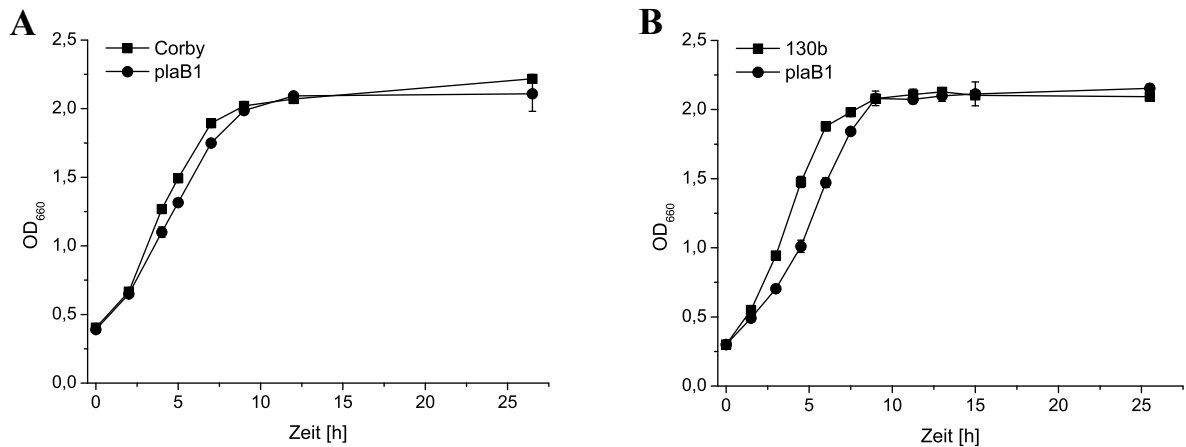


Abbildung 4.23: Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* Corby oder 130b und der isogenen *plaB* Mutanten bei pH6.5. Die Wildtypen *L. pneumophila* Corby (A) und 130b (B) und ihre isogenen *plaB* Mutanten wurden in BYE pH6.5 angezogen und die Zunahme der optischen Dichte bei 660nm bestimmt. Die Daten sind repräsentativ für Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

Obwohl Legionellen in Abhängigkeit vom Zelltyp, nach erfolgter Phagozytose, die Ansäuerung des Phagosoms und die Reifung im endozytotischen Netzwerk blockieren (138), zeigte sich in Wuchsanalysen unter leicht sauren Bedingungen (pH 6.5), dass die *plaB* Mutanten der Stämme Corby und 130b in ihrer Replikation leicht inhibiert waren (Abb. 4.23 A/B). Ein weiteres Absenken des pH-Wertes führte allerdings zu widersprüchlichen Ergebnissen. Hier zeigte die *plaB*-Mutante des Stammes 130b einen noch gravierenderen Replikationsdefekt (Abb. 4.24 B).

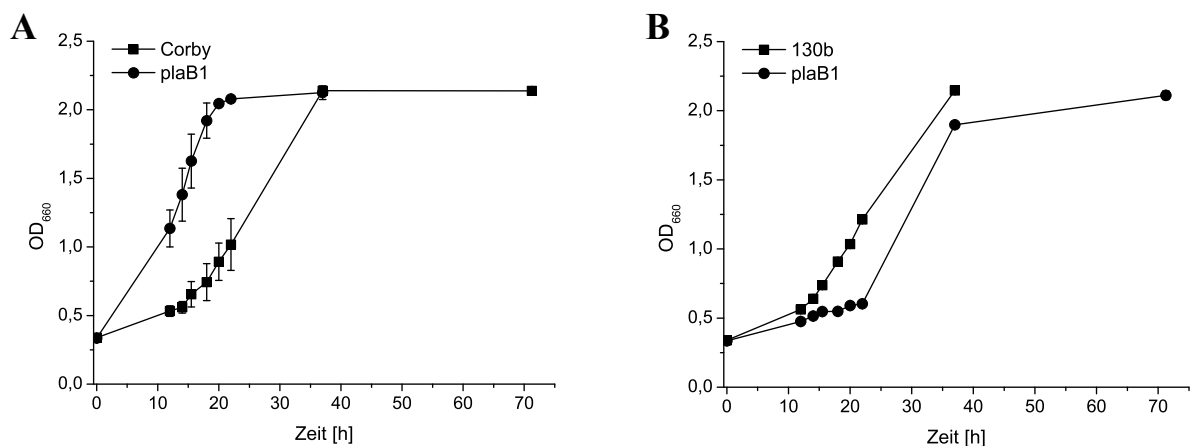


Abbildung 4.24: Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* Wildtypen und *plaB* Mutanten bei pH6.0. *L. pneumophila* Corby (A) oder 130b (B) und ihre isogenen *plaB* Mutanten wurden in BYE Bouillon bei erniedrigtem pH von 6.0 angezogen. Die Wachstumsrate der Stämme Corby Wildtyp und der *plaB* Mutante von 130b war extrem verlangsamt und musste über einen Zeitraum von bis zu ~ 70h dokumentiert werden. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten.

ERGEBNISSE

Die *plaB* Mutante des Stammes Corby hingegen verlor ihr Replikationsdefizit und wies unter sauren Bedingungen ein im Vergleich zum Wildtyp beschleunigtes Wachstum auf (Abb. 4.24 A).

Ob sich der Unterschied im Wuchsverhalten auf die Membranzusammensetzung der Legionellen auswirkt, wurde mittels Lipidextraktion und anschließender Dünnschichtchromatographie der polaren Lipide untersucht.

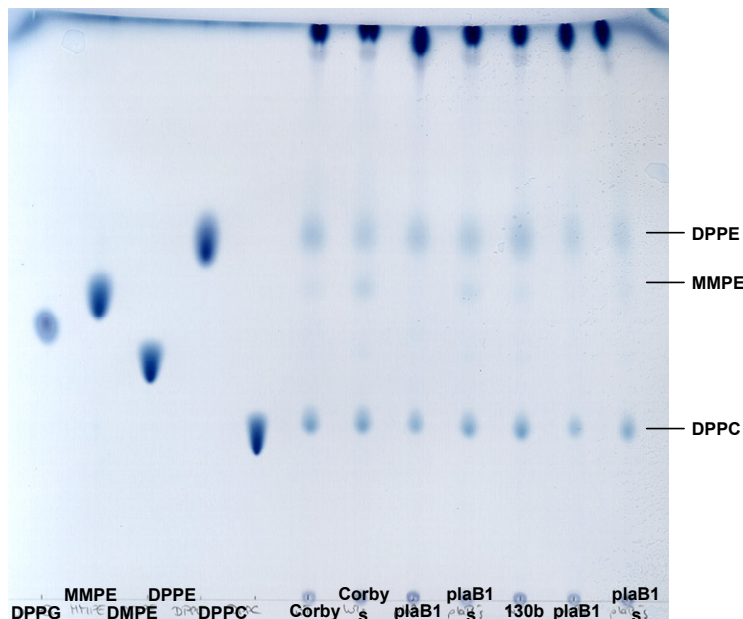


Abbildung 4.25: Polare Dünnschichtchromatographie extrahierter Lipide aus der Legionellenmembran, nach Wachstum bei pH6.0.

L. pneumophila Corby oder 130b und die isogenen *plaB* Mutanten wurden in BYE Bouillon pH6.0 angezogen und Lipide aus unterschiedlichen Wachstumsphasen extrahiert und untersucht. Proben der Ansätze wurden bei OD₆₆₀ von 2.0 – 2.1 entnommen, die Ansätze „s“ entsprechen den spät stationären Wachstumsphasen (72h). Die Analyse wurde zwei weitere Male wiederholt.

Die Lipidzusammensetzung der Legionellenmembran bei beiden Stämmen zeigte keine Alteration nach *plaB*-Deletion (Abb. 4.25). Der Grund für den observierten Mengenunterschied an Monomethylethanolamin (MMPE) zwischen beiden Wildtypen und den korrespondierenden Mutanten war auf das verlangsamte Wuchsverhalten der verschiedenen Stämme zurückzuführen. MMPE-Akkumulation in der späten stationären Phase (Abb. 4.25, gekennzeichnet durch „s“) konnte durch verlängertes Wachstum auch in der Membran der *plaB*-Mutante von Stamm 130b sowie der des Corby Wildtyps nachgewiesen werden. Die widersprüchlichen Ergebnisse im Wuchsverhalten der Stämme Corby bzw. 130b und den jeweiligen Mutanten konnten nicht durch das Einbringen eines *plaB*-exprimierenden Vektors komplementiert werden (nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass die Diskrepanz im Wuchsverhalten nicht auf die Aktivität von PlaB zurückzuführen ist, sondern durch eventuelle „second site“ Mutationen oder andere Faktoren beeinflusst wird.

ERGEBNISSE

Neben der Veränderung der Membranzusammensetzung zur Adaption an veränderte Umweltbedingungen könnte eine zell-assoziierte Phospholipase für die Bereitstellung fettsäurebasierender Nährstoffe wichtig sein. Daher wurden *L. pneumophila* Corby Wildtyp und die *plaB*-Mutante *plaB1* in BYE-Bouillon mit nur $\frac{1}{4}$ der herkömmlichen Menge an Hefeextrakt angezogen. Hierbei konnte die allgemeine Reduktion der Nährstoffe ebenfalls als unabhängig von der PlaB-Präsenz oder -Absenz ermittelt werden (Abb. 4.26 A).

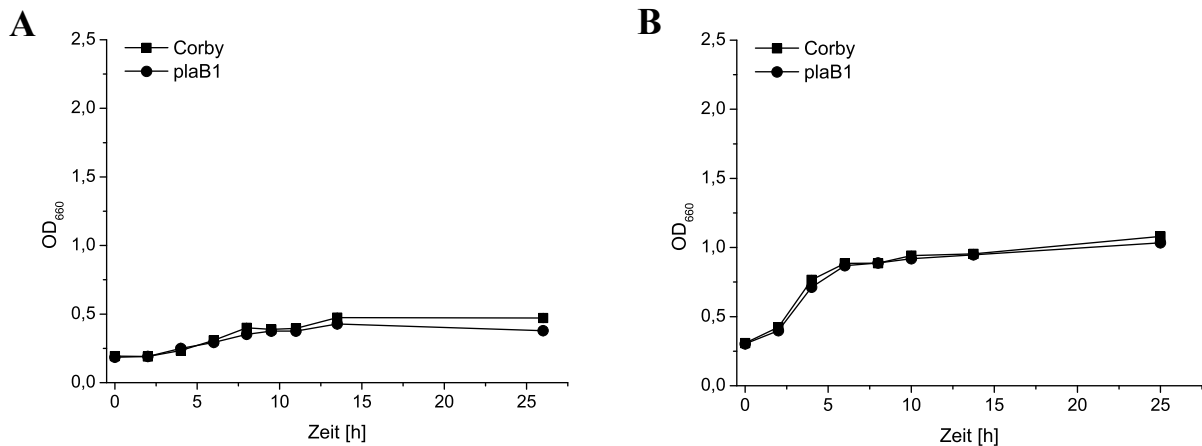


Abbildung 4.26: Wachstumsverhalten von *L. pneumophila* Wildtyp und *plaB* Mutante nach Reduktion an Nährstoffen oder Phosphat.

L. pneumophila Corby Wildtyp und die korrespondierende *plaB* Mutante wurden in ihrem Replikationsverhalten in verschiedenen Mangelmedien untersucht. A) Wachstum in BYE Bouillon mit nur $\frac{1}{4}$ Hefeextrakt. B) Wachstum in Phosphatmangelmedium, bei dem der Eisenpyrophosphatanteil durch Eisenchlorid ersetzt wurde (250mg/l).

Die starke phospho- und lysophospholipolytische Aktivität von PlaB kann Einfluss auf den Phosphatgehalt und –Anspruch der wachsenden Bakterien nehmen. Zu diesem Zweck wurde Eisenphosphat durch Eisenchlorid im Medium ersetzt und das Wachstumsverhalten der Wildtyp- und Mutantenstämme verglichen. Die *plaB*-Mutante zeigte keinen Effekt auf Phosphatmangel und replizierte in vergleichbarem Maßstab wie der Wildtypstamm *L. pneumophila* Corby (Abb. 4.26 B).

Die Zerstörung der „grenzflächenaktiven Substanz“ (*surface active agent* = surfactant) der Lunge, ein Gemisch aus Phospholipiden und Proteinen im Verhältnis 10:1, wird als Virulenzeigenschaft während einer bakteriellen Pneumonie diskutiert. Die Hydrolyse dieser Phospholipide durch eine sekretierte LPLA/PLA, PlaA, aus *Legionella* konnte schon *in vitro* nachgewiesen werden (92). Da durch die Spaltung von Phospholipiden toxische Lysophospholipide entstehen, die nicht nur gegenüber der Wirtszelle zytotoxisch sein können, ist eine Detoxifizierung auf bakterieller Seite durch die Aktivität einer LPLA möglich. Da auch PlaB diese Aktivität besitzt, wurde durch Zugabe von zytotoxischen Mengen (0,2mM) an Lysophosphatidylcholine (MPLPC) während der exponentiellen Wachstumsphase die

ERGEBNISSE

Notwendigkeit von PlaB für das Überleben der Bakterien untersucht. Wildtyp und *plaB*-Mutante zeigten in gleichem Maße eine Hemmung der Replikation nach Zugabe von MPLPC (Abb. 4.27). Demnach ist PlaB nicht essentiell für eventuelle Detoxifizierungen, zumindest nicht unter den getesteten Bedingungen.

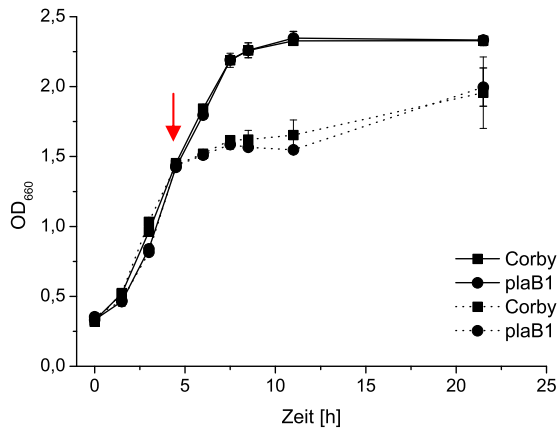


Abbildung 4.27: Wachstum von *L. pneumophila* Corby Wildtyp und *plaB* Mutante in Anwesenheit des Zytotoxins MPLPC.

L. pneumophila Corby Wildtyp und die *plaB* Mutante *plaB1* wurden bei Erreichen der mittleren exponentiellen Wachstumsphase durch Zusatz von toxischen Mengen (0,2mM) an MPLPC (roter Pfeil) in ihrer Replikation inhibiert. Dargestellt ist der Vergleich inhibierten Wachstums (gepunktete Linien) zu normal wachsenden Bakterienzellen (durchgezogene Linien) ohne das Zytotoxin MPLPC.

Zusammenfassend konnten durch Deletion der hauptsächlichen PLA/LPLA Aktivität von *Legionella pneumophila* keine Unterschiede in der Viabilität und den Membranzusammensetzungen der Bakterien in Abhängigkeit von PlaB festgestellt werden.

4.3.2. Untersuchungen zur LPS-Zusammensetzung

Aufgrund der Verankerung im äußeren Teil der Membran könnte PlaB indirekt Einfluss auf die Zusammensetzung des Lipopolysaccharides (LPS) der *Legionella* Bakterien nehmen. Daher wurde LPS aus *L. pneumophila* Wildtyp Corby, der *plaB* Mutante *plaB1*, der Komplementante *plaB1* (pJB04) und dem Überexpressionsstamm Corby (pJB04) extrahiert und mittels vergleichender SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Hierbei zeigte sich kein Unterschied im LPS-Profil zwischen den vier Stämmen (nicht gezeigt). Um dies zu verifizieren, wurden Wildtyp und Mutante auf ihre Reaktivität mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern (MAb) gegen *Legionella*-LPS im ELISA-Verfahren getestet (295). Es konnte bei keinem der MAbs (8/5, 3/1, 3, 8/4, 12/2, 88/1, 88/3, 30/4) ein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *plaB* Mutante festgestellt werden (Daten von Jürgen Helbig, TU Dresden). Somit ist die LPS Zusammensetzung von *Legionella* als PlaB-unabhängig zu betrachten.

4.3.3. PlaB als Bakteriozin

Das Lipidhydrolysespektrum von PlaB (Abb. 4.1 A) zeigte tendenziell eine Bevorzugung von Phospholipiden mit einer negativen Nettoladung als hauptsächliche Substratquelle. Die Membran von *L. pneumophila* weist jedoch einen hohen Bestandteil an Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE), bipolaren Lipiden ohne Nettoladung bei neutralem pH, auf (88). Da auch eukaryontische Zellen primär PC als Membranbestandteil der äußeren Lipidschicht tragen, stellt sich die Frage, wozu ein Bakterium eine derart potente Phospholipase, PlaB, mit gezeigtem Lipidhydrolysespektrum exprimiert. Ein möglicher Grund liegt in der Nutzung dieser Aktivität zur Abwehr von Konkurrenten z. B. im Verband des Biofilms. Zur Überprüfung dieser These wurden Legionellen mit einer Reihe an Gram negativen und Gram positiven Bakterien für 20h inkubiert und eine Inhibition des Wachstums dieser Stämme in Abhängigkeit von PlaB bestimmt. Da Legionellen auf LB-Agarplatten nicht kultivierbar sind, konnte durch Auftropfen der Suspension auf dieses Nährmedium selektiv die Anzucht der Konkurrenzstämme gefördert werden. Um Kontaminationen der Legionellensuspension zu überprüfen, wurden Wildtyp und *plaB* Mutante ohne Konkurrenz Bakterien inkubiert und ebenfalls auf LB-Kontrollplatten (Abb. 4.28 *L. pneumophila*) ausgebracht. Die Studie zeigte, dass Gram negative Bakterien kein Wachstumsdefizit durch die Anwesenheit von Legionellen aufwiesen (Abb. 4.28, verglichen werden hierbei WT bzw. PlaB- mit dem Wachstum der Bakterien ohne *Legionella* Konkurrenz, gekennzeichnet mit „/“). Bei Gram positiven Stämmen wurde jedoch eine Steigerung des Wachstums angedeutet, wenn diese mit Legionellen inkubiert wurden (*S. aureus* und *B. subtilis*). Ob und in welcher Weise *L. pneumophila* das Wachstum der beiden Konkurrenzstämme fördern könnte, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Wie sich sowohl bei Gram negativen als auch bei Gram positiven Stämmen herausstellte, war zwischen den Inkubationsansätzen des Wildtyps und der *plaB* Mutante kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

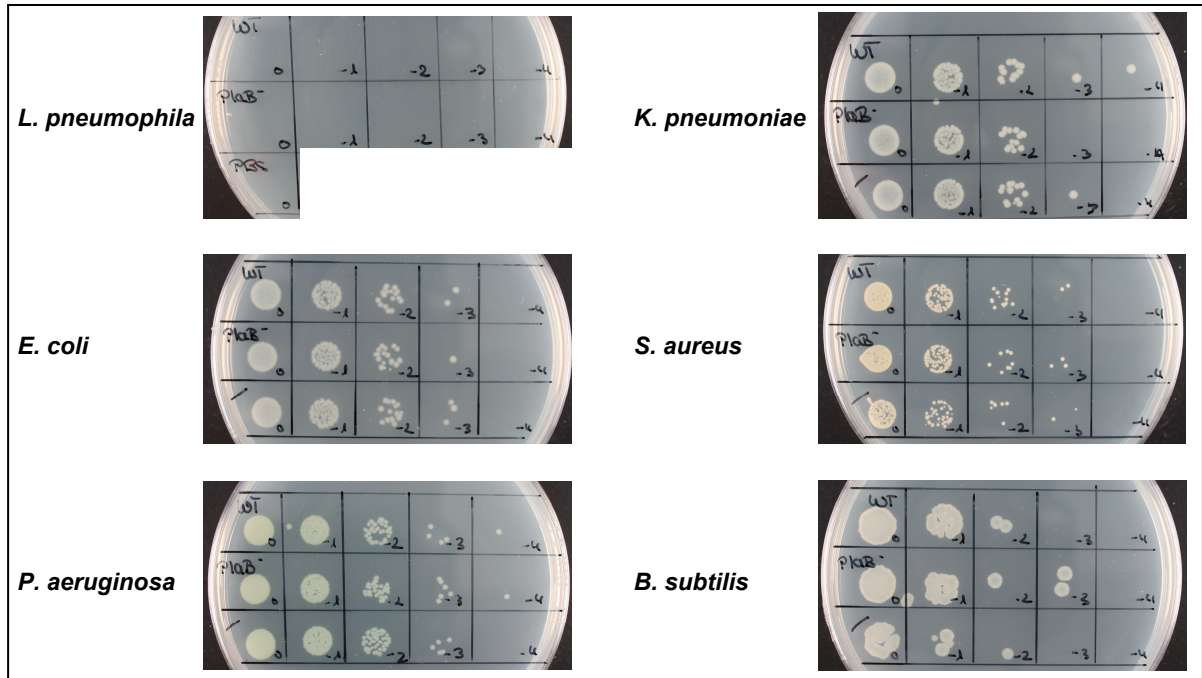


Abbildung 4.28: Untersuchung der bakteriziden Eigenschaften von PlaB.

L. pneumophila Wildtyp Corby (WT) oder *plaB* Mutante *plaB1* (PlaB-) wurden in einem Verhältnis von 100:1 (10^7 CFU/100µl zu 10^5 CFU/100µl) mit den Gram negativen Bakterien *E. coli*, *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* bzw. den Gram positiven Stämmen *S. aureus* oder *B. subtilis* für 20h bei 37°C in PBS inkubiert. Aliquots der verschiedenen Verdünnungsstufen (0/-1/-2/-3/-4) wurden auf LB-Agarplatten aufgetropft und das Wachstum der Konkurrenzstämme dokumentiert. Als Kontaminationskontrollen wurden sowohl Legionellen, als auch die Gram negativen bzw. positiven Bakterien ohne einen *Legionella* Konkurrenten (/) inkubiert. Stämme: *Legionella pneumophila* Corby (*L. pneumophila*); *Escherichia coli* DH5α (*E. coli*); *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (*P. aeruginosa*); *Klebsiella pneumoniae* RK1 508 (*K. pneumoniae*); *Staphylococcus aureus* H1 (*S. aureus*); *Bacillus subtilis* ATCC6633 (*B. subtilis*). Die Aufnahmen sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Demnach ist unter den getesteten Bedingungen auszuschließen, dass PlaB zur Verteidigung der Legionellen im sozialen Umfeld als Bakteriozin eingesetzt wird.

4.3.4. Untersuchung der intrazellulären Vermehrung und lipolytischer Aktivität von *L. pneumophila* *plaB* Mutanten in Zellkultur

Die intrazelluläre Vermehrung der Wildtypen *L. pneumophila* Corby und 130b in den Infektionsmodellen *A. castellanii* und U937 Makrophagen unterschied sich nicht von ihren isogenen *plaB* Mutanten (94). Um zu überprüfen, ob und in welchem Maße *plaB* unter Infektionsbedingungen exprimiert wird, wurden U937 Makrophagen mit *L. pneumophila* Wildtyp Corby, der *plaB* Mutante *plaB1* und einem Komplementationsstamm *plaB1* (pKH192) infiziert. Die Expression des Gens wurde mittels RT-PCR, die Aktivität des Enzyms per Lipidhydrolyse untersucht und die koloniebildenden Einheiten auf Agarplatte bestimmt. Hierbei zeigte sich erneut kein Unterschied in der Vermehrungseffizienz der drei Stämme (Abb. 4.29 A). In der Hydrolyse von DPPG und MPLPC (Abb. 4.29 B+C) der Zelllysate wurde jedoch deutlich, dass die hauptsächliche lipolytische Aktivität während einer

ERGEBNISSE

Legionelleninfektion auf PlaB zurückzuführen ist. Die *plaB* Mutante war nicht mehr in der Lage, die eingesetzten Lipide zu spalten, und hatte daher ein vergleichbares Lipolyseniveau wie die uninfinzierte Kontrolle der U937 Makrophagen.

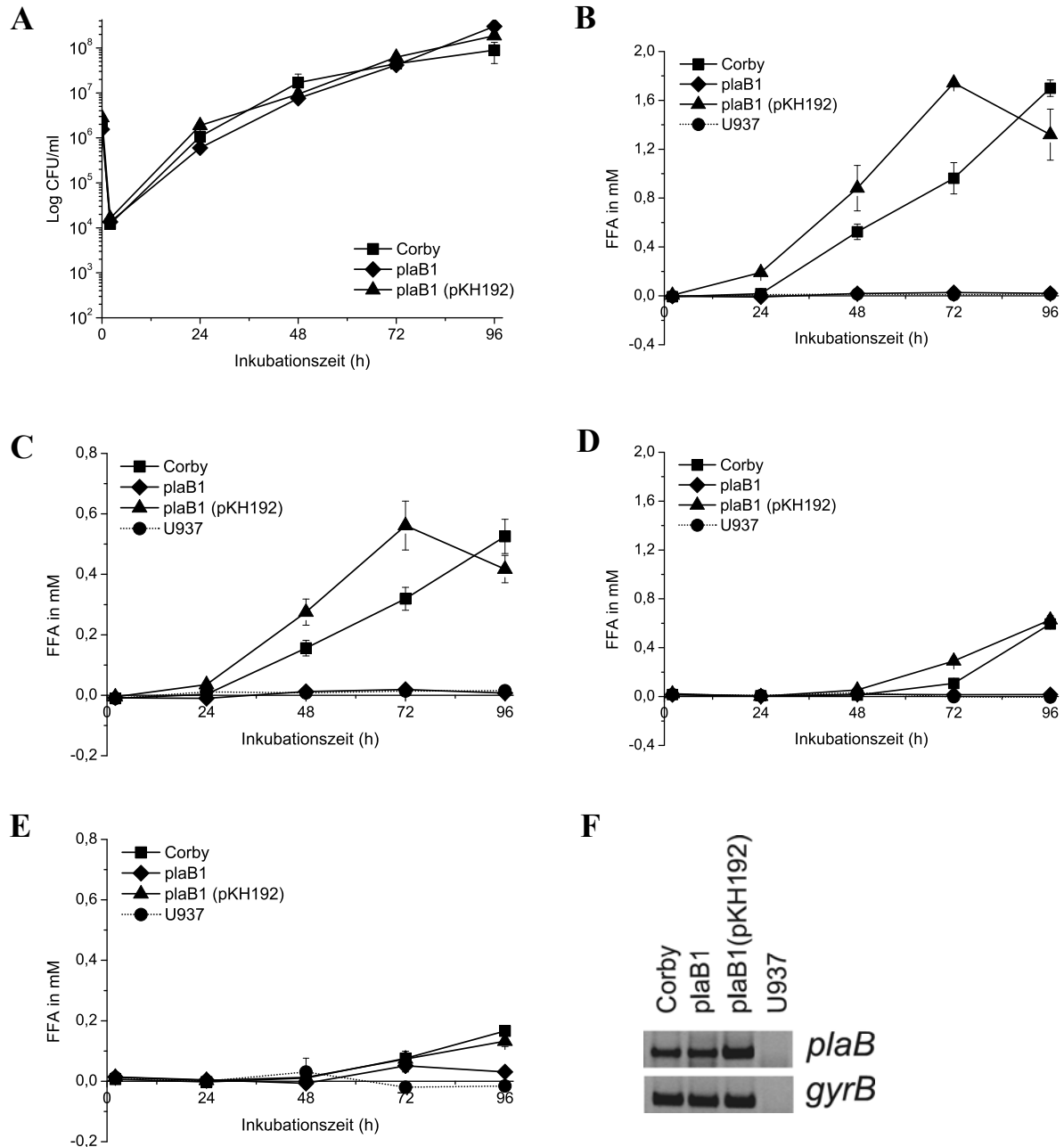


Abbildung 4.29: Bestimmung der lipolytischen Aktivität und der Expression von *plaB* während einer Makrophageninfektion.

U937 Makrophagen wurden mit einer MOI1 mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *plaB* Mutante plaB1 und einem Komplementationsstamm plaB1 (pKH192) infiziert. A) Bestimmung der Vermehrungsrate durch CFU-Zählung. B) DPPG-Hydrolyse der Zelllysate und D) korrespondierenden Überständen. C) MPLPC-Hydrolyse der Zelllysate und der zugehörigen E) Überstände der Infektion. F) RT-PCR zur Bestimmung der Expression von *plaB* nach 48h Infektionsdauer. Da die Oligonukleotide zur Bestimmung des *plaB* RNA-Transkriptes vor dem Insertionsort der Kanamycin-Resistenzkassette liegen, ist auch in der *plaB* Mutante RNA nachweisbar. Als quantitative Kontrolle wurde die Expression der Untereinheit B der bakteriellen DNA Gyrase (*gyrB*) mitgeführt. Die Daten repräsentieren Triplicate von mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Um auszuschließen, dass es sich bei den gemessenen Aktivitäten um zelluläre Phospholipaseaktivität des Infektionswirtes handelt, wurden diese durch Zugabe von 6,25mM (Endkonzentration) EDTA im Lipidhydrolyseansatz inhibiert. Die Freisetzung von Fettsäuren durch Phospholipasen in den Überständen der Infektion (Abb. 4.29 D+E) nach 72h und 97,5h der Inkubation ist wahrscheinlich auf zunehmende Zelllyse zurückzuführen, da die Bakterien durch Filtration (0,2µm) von den Überständen separiert wurden. Im Weiteren konnte die Expression des *plaB*-Gens mittels RT-PCR Analyse exemplarisch nach 48h Inkubation eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 4.29 F). DNA-Kontaminationen konnten ausgeschlossen werden. Zusammenfassend zeigte dies, dass *plaB* während des Infektionsprozesses exprimiert wird und die größte PLA/LPLA Aktivität direkt auf das Enzym zurückzuführen ist.

Die verwendete *plaB* Mutante *plaB1* wurde mittels Integration einer Kanamycinkassette in das entsprechende *plaB*-Gen hergestellt. Die Unterbrechung des Leserasters führte zu totalem Aktivitätsverlust des Enzyms. Jedoch wurde nachweislich immer noch mRNA gebildet (s. 4.29), welche eventuell in Proteinfragmente translatiert werden und durch phospholipolytischunabhängige Funktionen in zelluläre Prozesse eingreifen könnten. Durch isogene Deletionsmutanten wurde jedoch bestätigt, dass PlaB-Fragmente, die durch die Insertionsmutante entstehen könnten, keinen Einfluss auf die Vermehrungseffizienz der *plaB* Mutante haben (246). Die Deletionsmutanten wurden im Weiteren für IL-8 ELISA-Studien verwendet (s. 4.3.6.2).

4.3.5. Untersuchung zur intrazellulären Vermehrung der *L. pneumophila plaB* Mutante nach Meerschweincheninfektion

Infektionsstudien von *in vitro* Modellsystemen, wie z. B. U937 Makrophagen, sind ein gängiges und gutes Verfahren zur Überprüfung des Virulenzpotentials von *Legionella* Bakterien. Sie spiegeln jedoch nicht die Komplexität und Organisation eines ganzen Organismus wider, wie z. B. die Zell-Zellkommunikation und daraus resultierende Prozesse. Da, wie bereits *in vitro* belegt, kein anderes Enzym von *L. pneumophila* so starke extra- und intrazelluläre Aktivitäten aufweist, war es von Interesse, ob sich die *plaB* Mutante in Meerschweincheninfektionsexperimenten vergleichbar zum Wildtyp replizieren kann.

4.3.5.1. Bestimmung der Bakterienlast in Meerschweinchenlungen und Milz

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Higa (Universität Ryukyus, Japan) konnte bereits gezeigt werden, dass PlaB entscheidend zur Virulenz der Legionellen im Tierversuch beiträgt (247). Zur Verifizierung und für weitergehende Experimente wurden männliche Meerschweinchen des Stammes Hartely intratracheal mit 10^6 *L. pneumophila* Corby Bakterien infiziert. Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Tiere euthanasiert und sowohl Lungenflügel, als auch die Milz auf ihre Legionellenlast untersucht. Hierzu wurden die Lungen- und Milzhomogenisate in verschiedenen Verdünnungen auf BYCE-Agarplatten ausplattiert und die CFU-Werte bestimmt. Es zeigte sich, dass die *plaB* Mutante in der Vermehrung in der Lunge als auch in der Verbreitung zur Milz inhibiert war (Abb. 4.30 A/C).

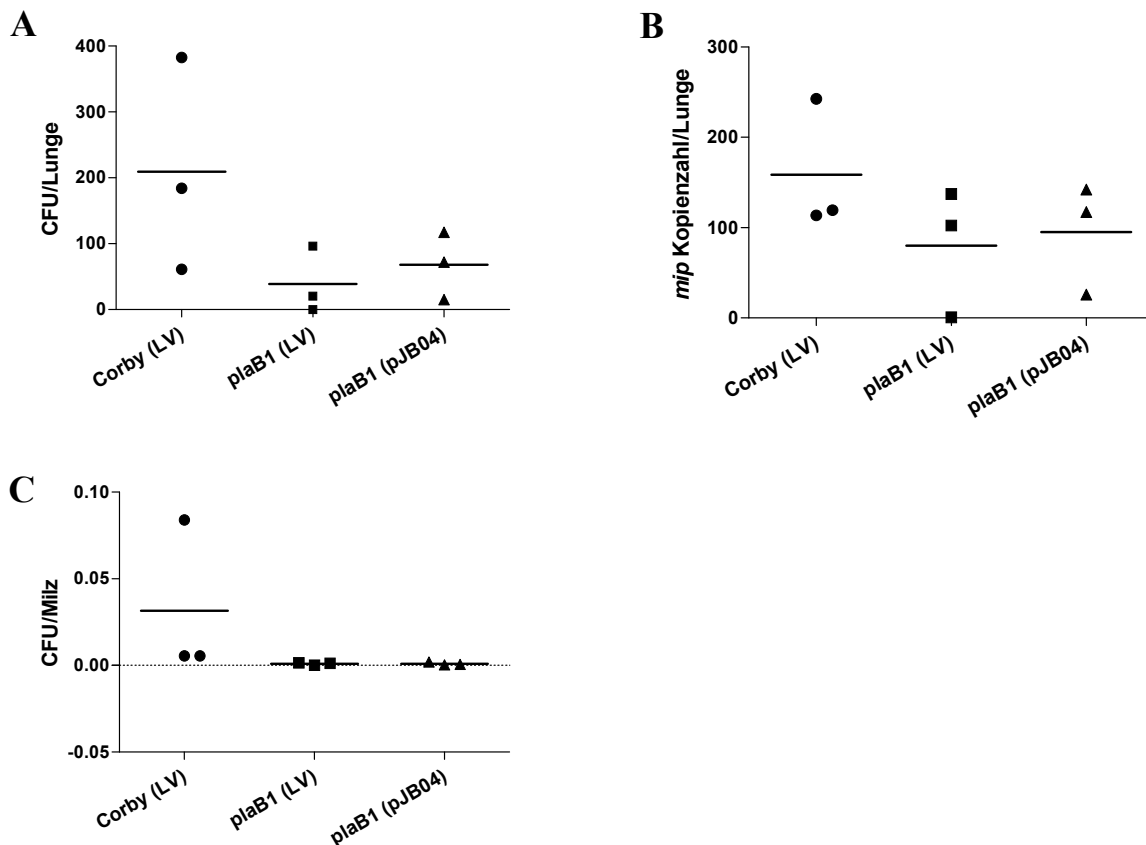


Abbildung 4.30: Bestimmung der Bakterienlast in Meerschweinchenlungen mittels CFU-Zählung und real-time PCR. Drei Meerschweinchen pro Stamm wurden mit je 1×10^6 Bakterien infiziert, nach 2 Tagen Inkubation euthanasiert und die Bakterienlast in der Lunge per Zählung der „colony forming units“ (CFU) (A) und mittels real-time PCR (B) bestimmt. Bei der angegebenen Kopienzahl des „macrophage infectivity potentiator“ *mip* gilt: 1 Kopie des Gens = 1 Bakterienzelle. C) Bestimmung der CFU in Milzhomogenisaten. Dargestellte Werte entsprechen der Bakterienmenge des jeweiligen Organs dividiert durch das Inokulum der Infektion. Dieses Experiment wurde in Kooperation mit Prof. Higa und erhöhter Tierzahl zweimal wiederholt (1.n=3; 2.n=4). LV = Leervektor pBCKS.

Die Bakterienlast in den Lungen wurde zusätzlich durch real-time PCR Analysen mit Hilfe von *mip*-Taqman-Sonden verifiziert (Abb. 4.30 B). Der Vermehrungsdefekt der Mutante konnte somit bestätigt werden, jedoch wiesen die Werte eine sehr hohe Diskrepanz innerhalb der einzelnen Infektionsgruppen, z. B. innerhalb der mit der *plaB* Mutante infizierten Tiere,

auf. Durch real-time PCR können auch unkultivierbare Bakterien oder bereits tote Zellen erfasst werden. Dies könnte die erhöhten *mip* Kopienzahlen der *plaB* Mutante erklären, da die Werte der CFU-Zählung deutlich unter denen des Wildtypes lagen (Abb. 4.30 A+B). Der Replikationsdefekt der *plaB* Mutante konnte zum Teil durch das Einbringen eines *plaB*-tragenden Expressionsplasmides (pJB04) ausgeglichen werden, erreichte jedoch nicht Wildtyplevel (Abb. 4.30 A). Ein Grund hierfür könnte der Verlust des Plasmides vor oder während der Infektion sein, da von den Bakterien post Infektion nur noch sehr wenige der Komplementanten die plasmidständige Chloramphenicolresistenz aufwiesen. Dies wurde durch Ausplattieren auf antibiotikahaltigen BCYE-Agarplatten bestimmt. Histologische Untersuchungen des Lungengewebes ergaben deutlich stärkere Entzündungsprozesse bei Wildtyp- und Komplementanteninfektionen als bei vergleichbaren Sektionen der mit der *plaB* Mutante infizierten Meerschweinchen (247).

4.3.5.2. Untersuchungen zur veränderten Lipidzusammensetzung der Lungenproben nach Legionelleninfektion

Wie im Tiermodell gezeigt, trägt PlaB zur Virulenz von Legionellen bei (Abb. 4.28). Da PlaB besonders starke hydrolytische Aktivität gegenüber Phospholipiden aufweist, könnte eine mögliche Funktion während des Infektionsprozesses darin bestehen, zelluläre Lipide abzubauen. Aus diesem Grund wurden mittels Dünnschichtchromatographie und Bestimmung freier Fettsäuren mögliche Veränderungen in der Lipidzusammensetzung der Meerschweinchenlungen untersucht. Die Dünnschichtchromatographien mit Laufmitteln zur besonderen Auftrennung polarer, apolarer und cholesterolesterspezifischer Lipide zeigten keinen gravierenden Unterschied in den Lipidbestandteilen der infizierten oder nichtinfizierten Meerschweinchenproben (Abb. 4.31 A/B/C). Auch die Lipidzusammensetzungen der Lungenproben der mit *L. pneumophila* Wildtyp oder der *plaB* Mutante und dem Komplementationsstamm *plaB1* (pJB04) infizierten Tiere verhielten sich ähnlich. Einen geringfügigen Unterschied konnte man jedoch zwischen dem Salinekontrolltier (PBS) und den mit Legionellen infizierten Meerschweinchen feststellen. Hierbei waren auf der Chromatographieplatte weniger freie Fettsäuren bei dem PBS-Kontrolltier zu erkennen (Abb. 4.31 B/C).

ERGEBNISSE

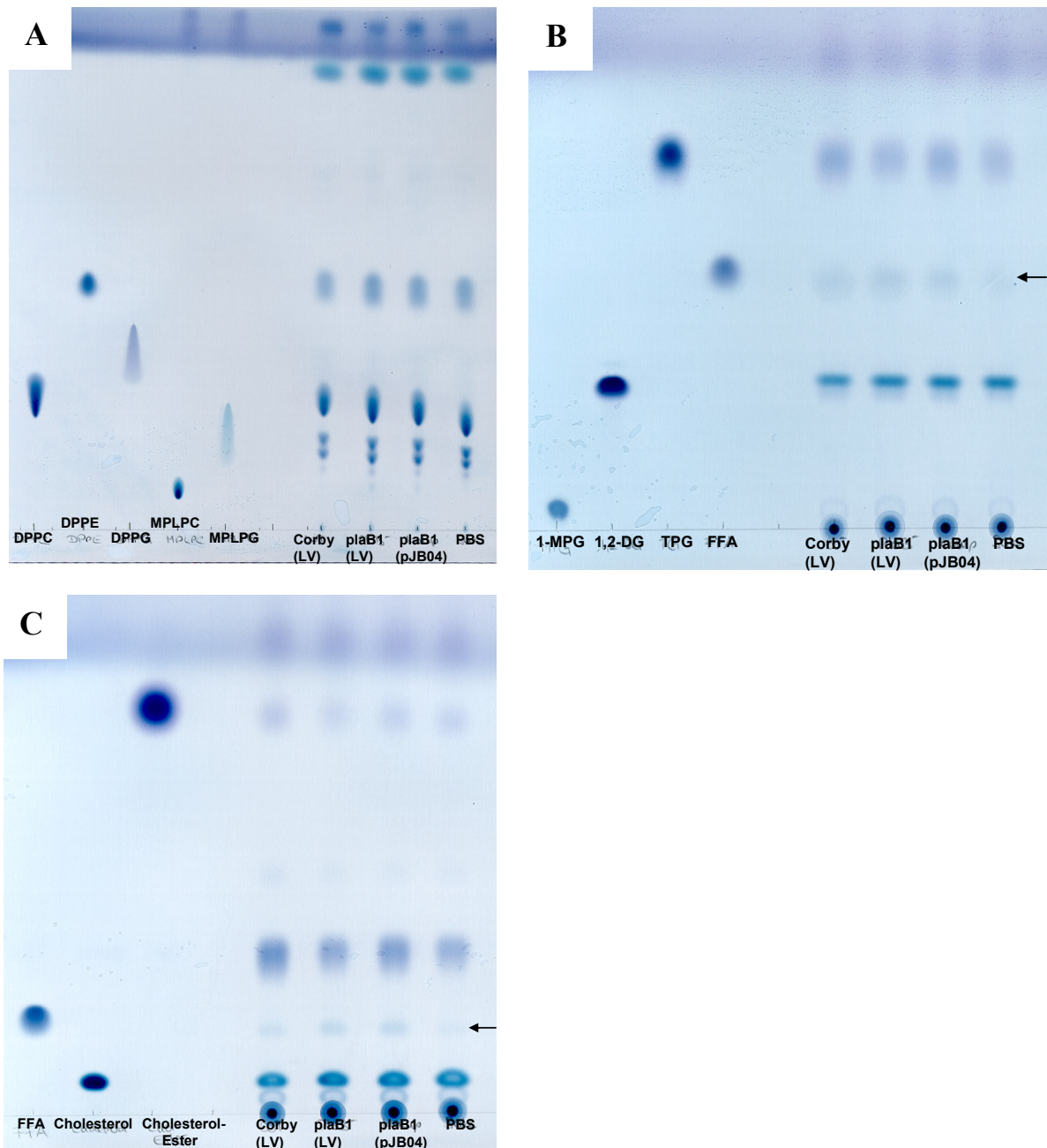


Abbildung 4.31: Dünnschichtchromatographische Analyse der extrahierten Lipide aus infizierten Meerschweinchenlungen.

Aus 50mg infiziertem Lungengewebe wurden quantitativ Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie bei unterschiedlichen Laufmitteln verglichen. Dargestellt sind jeweils die extrahierten Proben aus den infizierten Tieren Nr.1, Corby (LV) 1, plaB1 (LV) 1, plaB (pJB04) 1 und das mit PBS infizierte Kontrolltier. A) polare Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel Chloroform:Methanol:Wasser 65:25:4. B) apolare Dünnschichtchromatographie mit dem Laufmittel n-Hexan:Diethylether:Eisessig 70:30:4. C) Cholesterolesterdetektion mit dem Laufmittel Petrolether:Diethylether:Eisessig 90:10:1. Der schwarze Pfeil markiert den reduzierten Fettsäureanteil im PBS-Kontrolltier. LV=Leervektor pBCKS.

Um dies zu verifizieren und zu quantifizieren, wurden erneut Lipide aus 50mg der Meerschweinchenproben extrahiert und auf ihren Gehalt an freien Fettsäuren mittels des NefaC-Kits untersucht. Abbildung 4.32 A+B zeigt die Einzelwerte der gemessenen freien Fettsäuren im Vergleich zu den Einzelwerten der CFU-Bestimmung der jeweiligen Tiere aus dem Infektionsversuch. Eine Zunahme an freien Fettsäuren mit ansteigender Bakterienmenge war deutlich zu erkennen. Dies verhielt sich aber unabhängig von der *plaB*-Expression. So

ERGEBNISSE

zeigte zwar die *plaB* Mutante in Tier 1 (*plaB*1 (LV) 1) eine geringere CFU-Anzahl als die Wildtypinfektion in Tier 1 (Corby (LV) 1), jedoch in der Bestimmung der Fettsäuren einen leicht erhöhten Spiegel an freien Säureketten (Abb. 4.32).

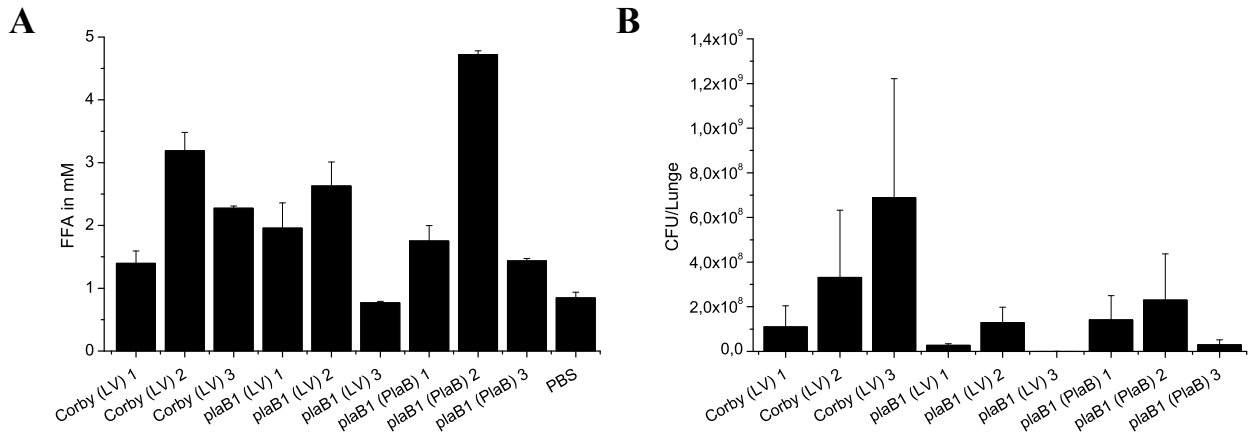


Abbildung 4.32: Bestimmung der freien Fettsäuren aus der Meerschweinchenlunge im Vergleich zu dokumentierten CFU-Werten.

A) Aus je 50mg der Meerschweinchenlungen wurden Lipide extrahiert und 1/10 dieser zur Bestimmung der freien Fettsäuren für jedes einzelne Tier herangezogen. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von 3 unabhängigen Experimenten. B) Korrespondierende Bakterienlast dargestellt in koloniebildenden Einheiten (CFU) pro infizierten Meerschweinchenlungen (s. Abb 4.30 A). Für die Experimente wurden je drei Tiere zur Infektion mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *plaB* Mutante *plaB*1 und der Komplementante *plaB*1 (pJB04) verwendet. Ein Tier wurde mit PBS inokuliert und diente als Kontrolle für fortlaufende Experimente. LV=Leervektor pBCKS.

Aus den erfassten Daten der Lipidzusammensetzungen und der Bestimmung freier Fettsäuren konnte keine Aussage über eine mögliche Funktion von PlaB als wirtszellzerstörender Virulenzfaktor während einer Legionelleninfektion getroffen werden.

4.3.6. Beeinflussung der Zytokinexpression durch PlaB

Zellzerstörung durch besonders aktive Phospholipasen während einer Wirtszellinfektion stellt einen möglichen Mechanismus zur Etablierung der replikativen Nische von Pathogenen dar. Dies konnte anhand des α -Toxins aus *C. perfringens* oder auch von ExoU aus *P. aeruginosa* eindeutig gezeigt werden. Es wird jedoch angenommen, dass neben zytotoxischer Aktivität vielmehr die sublytischen Mengen der Enzyme zur Veränderung der Signaltransduktionswege der Zielzelle beitragen und so aktiv auf die Immunantwort des Wirtes Einfluss nehmen (45,49,65,100,234). Ob Ähnliches auch auf PlaB zutrifft und dieses den Replikations- und Verbreitungsdefekt im Meerschweinchenmodell zum Teil erklären könnte, sollte im Folgenden durch Untersuchung *plaB*-vermittelter Zytokinsekretion bestimmt werden.

4.3.6.1. „Screening“ auf veränderte Zytokinexpression nach Infektion von A549

Lungenepithelzellen

Ein Dot Blot, basierend auf Protein-Antikörper-Interaktion, sollte einen ersten Überblick geben, welche entzündungsreaktiven Faktoren durch PlaB beeinflusst werden. Hierzu wurden A549 Zellkulturüberstände nach einer Infektion mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp, der *plaB* Mutante und der Komplementante *plaB1* (pJB04) mit dem „Human Inflammation Antibody Array 3“ der Firma RayBio® inkubiert (s. Material und Methoden) und Veränderungen unter 40 verschiedenen Entzündungsmediatoren untersucht. Werte >10% der Positivkontrolle (=100%) wurden als signifikant eingestuft und näher betrachtet. Hierbei zeigten sich 4 Zytokine von der Expression von *plaB* beeinflusst. Die Sekretion der Chemokine Interleukin 8 (IL-8), Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) und RANTES („*regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*“), sowie des Inhibitors von Metalloproteinasen TIMP-2 war in den mit der *plaB* Mutante infizierten A549 Zellen reduziert (Abb. 4.33 A/B). Die Defekte konnten durch episomale Expression von *plaB* komplementiert werden. Die negative Darstellung der TIMP-2 Sekretion kommt durch die Subtraktion der durch Legionellen infizierten Ansätze von denen der uninfizierten Kontrolle zustande. Somit reprimiert *L. pneumophila* generell die Expression bzw. Sekretion des Inhibitors von Metalloproteinasen, welche eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Wundheilung des Bindegewebes einnehmen.

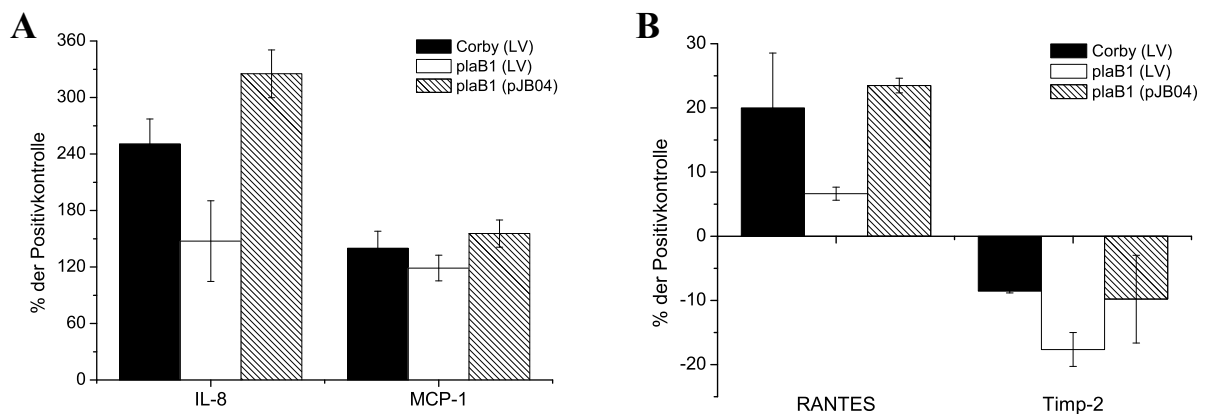


Abbildung 4.33: Sekretion von Entzündungsmediatoren nach Legionelleninfektion.

A549 Lungenepithelzellen wurden mit *L. pneumophila* Corby Wildtyp (Corby), der *plaB* Mutante (*plaB1*) und der Komplementante (*plaB1*-pJB04) infiziert und die Sekretion putativer Signalmoleküle in den Überstand bestimmt. Bei diesem „Screen“ auf 40 verschiedene Entzündungsmediatoren zeigten drei Chemokine (IL-8, MCP-1 und RANTES) und der Inhibitor von Metalloproteinasen Timp-2 eine PlaB-abhängige Sekretion. Die Daten repräsentieren Doppelwerte von insgesamt 3 unabhängigen Experimenten. LV = Leervektor pBCKS.

PlaB hat demnach sowohl stimulierende, aber auch inhibierende Wirkung auf das Immunsystem. Zum einen werden Immunzellen durch Chemoattraktoren zum Infektionsort

gelockt, zum anderen aber wird durch Stimulierung der Inhibitorsekretion der Abbau der extrazellulären Matrix verhindert und somit die Durchlässigkeit des Gewebes vermindert.

4.3.6.2. Quantifizierung der Zytokinsekretion mittels „Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)“

Die durch die *Screening*-Methode (s. 4.3.6.1) identifizierten Entzündungsmediatoren sollten im Weiteren durch Quantifizierung mittels ELISA verifiziert werden. Dabei wurde vor allem die Sekretion des Chemokins IL-8 genauer untersucht. Zur Etablierung und Verbesserung des

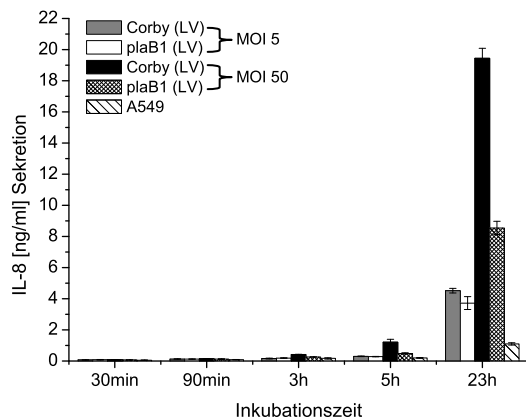


Abbildung 4.34: Kinetik der Legionellen-induzierten IL-8 Sekretion.

A549 Lungenepithelzellen wurden mit *L. pneumophila* Corby und der *plaB* Mutante *plaB1* infiziert und die Sekretion des Chemokins IL-8 zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hierbei konnte erst nach 5-stündiger Inkubation und einer ausreichend großen Bakterienmenge (MOI50), IL-8 Sekretion erfolgreich detektiert werden. Die Daten repräsentieren Triplikate von 3 unabhängigen Experimenten. LV = Leervektor pBCKS.

ELISA-Experimentes wurde eine Kinetik der Legionellen-induzierten IL-8 Sekretion erstellt. A549 Lungenepithelzellen wurden mit *L. pneumophila* Wildtyp und der *plaB* Mutante *plaB1* infiziert und die Abgabe des Chemoattraktors in den Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die durch Bakterien induzierte IL-8 Sekretion nach ca. 5 Stunden messbar ist, eine gute Effektstärke jedoch erst bei Inkubationen über Nacht (>15h) erreicht wird (Abb. 4.34). Im Weiteren sollte festgestellt werden, ob die hydrolytische Aktivität und somit die Möglichkeit, z. B. Lysophosphatidylcholin (LPC) zu generieren, ausschlaggebend für die Induktion der IL-8 Expression ist. Das PlaB in der Lage ist, LPC aus dem Vorläufer Phosphatidylcholin zu generieren, konnte bereits experimentell bestätigt werden (94). Daher wurden Mutanten des katalytischen Zentrums auf ihre Fähigkeit hin überprüft, IL-8 Sekretion zu vermitteln. Wie in Abbildung 4.35 zu sehen, ist die *plaB* Mutante in der Induktion der IL-8 Expression reprimiert, welches durch Einbringen eines *plaB*-exprimierenden Vektors wiederhergestellt werden konnte (Abb. 4.35 A). Die verschiedenen Mutanten des katalytischen Zentrums (S85A/D203N/H251N) waren zwar in der Lage, etwas mehr IL-8-Sekretion zu stimulieren als die *plaB* Mutante mit entsprechendem Leervektor

ERGEBNISSE

(*plaB1*-LV), zeigten sich jedoch im Vergleich zum Wildtyp *plaB*-exprimierenden Stamm (*plaB1*-PlaB) in der Expression des Chemokins reduziert (Abb. 4.35 A).

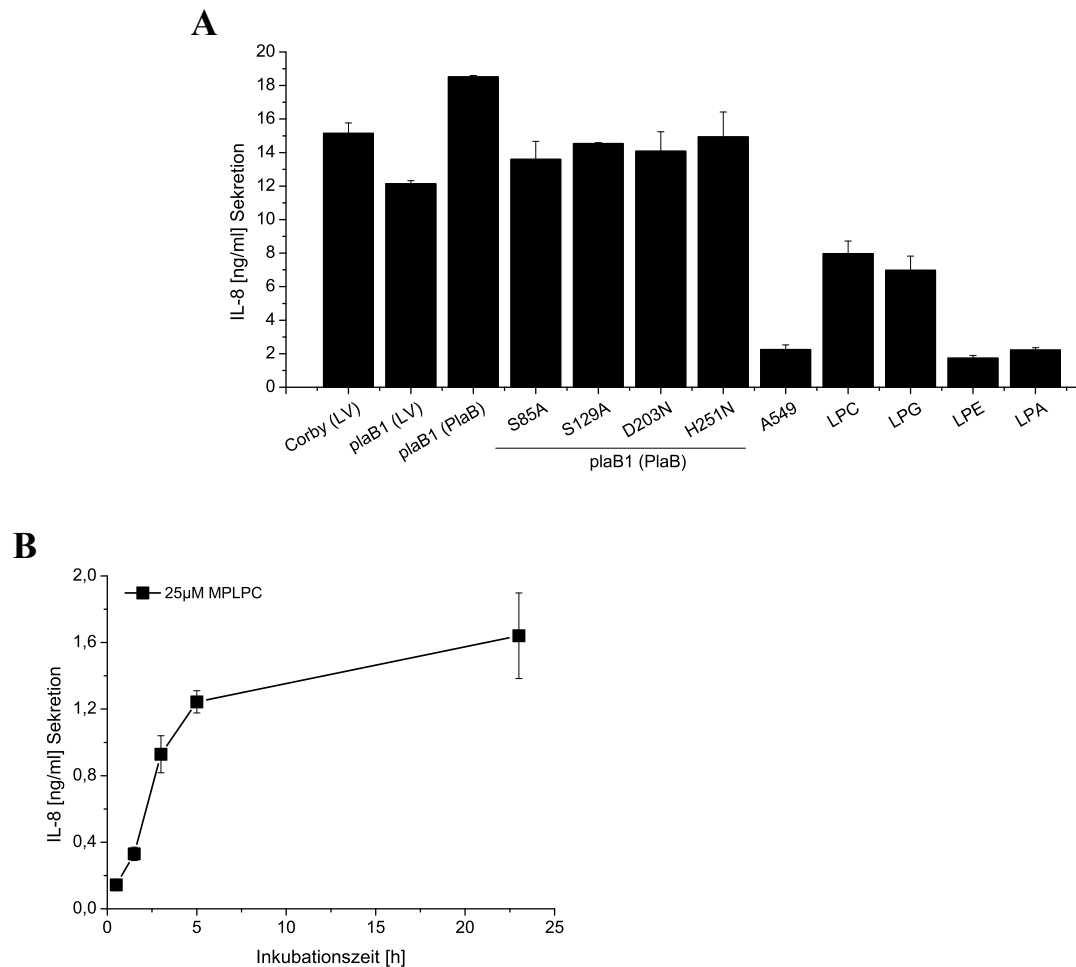


Abbildung 4.35: IL-8 Sekretion in Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von PlaB und der Lysophospholipide MPLPC und MPLPG.

A) A549 Lungenepithelzellen wurden entweder mit *L. pneumophila* Corby, der *plaB* Mutante *plaB1*, der Komplementante *plaB1* (PlaB) oder Mutanten des katalytischen Zentrums mit einer MOI 10 infiziert und die Sekretion des Chemokins IL-8 nach 18h Inkubation bestimmt. Vier Lysophospholipide (MPLPC, MPLPG, MPLPE, MPLPA) wurden in einer Konzentration von 25μM eingesetzt und die Freisetzung von IL-8 dokumentiert. B) Zeitabhängige Sekretion des Interleukins durch Inkubation der A549 Zellen mit 25μM MPLPC. Die Daten repräsentieren Triplikate von mindestens 3 unabhängigen Experimenten. LV = Leervektor pBCKS.

Ein ähnliches Bild ergab sich mit den Überständen der Infektion der S129A Mutante. Diese trägt einen Aminosäureaustausch, der vor allem für die Spaltung von Lipiden mit Cholinseitenketten von Bedeutung ist. Auch die Mutante war in der IL-8 Sekretion im Vergleich zum Komplementationsstamm *plaB1* (PlaB) reduziert.

Der nächste Schritt in der Aufklärung der durch eine Phospholipase induzierten Chemokinsekretion war die Suche nach der aktivierenden Substanz. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden verschiedene Lysophospholipide, mögliche Reaktionsprodukte von PlaB, auf Induktion der IL-8 Sekretion untersucht. Hier waren vor allem MPLPC und MPLPG in der Lage, dosisabhängig (Maximum bei 25μM) die Expression und Sekretion des

Chemokins zu induzieren. Eine detaillierte Kinetik der MPLPC-induzierten IL-8 Expression zeigte deutlich, dass sich nach nur 5h die Sekretion nahe der Sättigungsgrenze befand (Abb. 4.35 B).

Es sollte erwähnt werden, dass etliche Wiederholungen des Experimentes zum Teil gegenläufige Resultate ergaben. So war z. B. die *plaB* Mutante nicht mehr in der IL-8 Sekretion inhibiert oder der Überexpressionsstamm komplementierte nicht mehr. Die *plaB* Mutante wies durch die Insertion einer Kanamycin-Resistenzkassette immer noch *plaB* Transkript auf (s. 4.29). Um zu untersuchen, ob mögliche PlaB-Fragmente für die Schwankungen bezüglich der IL-8 Sekretion verantwortlich sind, wurden ELISA-Experimente mit den *plaB* Deletionsmutanten durchgeführt. Diese unterlagen jedoch gleichermaßen den zuvor beobachteten Variationen. Da ähnliche Ergebnisse auch für die weiter oben erwähnten Zytokine erzielt wurden, kann heute noch nicht eindeutig belegt werden, ob und in welchem Ausmaß PlaB zur Sekretion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren beiträgt.

4.3.6.3. Untersuchung zum Einfluss von PlaB auf die Flagellenexpression

Die bakterielle Flagelle ist ein besonders potenter Stimulator des angeborenen Immunsystems. Die erste physikalische und immunmodulatorische Barriere der Atemwege, die Epithelzellschicht der Mukosa, zeigt sich besonders durch den Bewegungsapparat der Pathogene aktiviert (210). Die resultierende Signaltransduktion wird in Legionellen und anderen Bakterien unter anderem durch das Transmembranprotein „*Toll-like*“ Rezeptor 5 (TLR5) vermittelt, welches die Flagelle als sogenanntes pathogen-assoziiertes molekulares Muster („*pathogen-associated molecular pattern*“, PAMP) erkennt und die Immunantwort einleitet (123,124). Die Induktion der Interleukin-8 Sekretion kann dabei ein Resultat der flagelleninduzierten immunmodulatorischen Antwort sein (123,241). Daher war es von Interesse zu überprüfen, ob die *plaB*-abhängige IL-8 Sekretion durch Veränderungen in der Flagelle zustande kommt. Die Stämme *L. pneumophila* Wildtyp Corby, die korrespondierende *plaB* Mutante und Komplementante wurden für 7 Tage auf BCYE-Platten bei 30°C (optimale Temperatur für die Flagellenexpression (200)) kultiviert und anschließend die Flagellen nach Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Menge an Flagellenprotein FlaA (nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich durch Analysen der FlaA-Menge zwischen Wildtyp und Mutante in Western Blot Analysen (Heuner, unveröffentlichte Daten). Der Einfluss von PlaB auf die Sekretion wichtiger

ERGEBNISSE

Entzündungsmediatoren kann demnach als unabhängig von der Flagellenexpression angesehen werden.

5 Diskussion

5.1. Identifizierung wichtiger Aminosäuren und Proteindomänen für die lipolytische Aktivität von PlaB

5.1.1. PlaB und Homologe, eine neue Familie von Phospholipasen

L. pneumophila kodiert für eine Reihe an phospholipolytischen Enzymen, von denen ein Großteil in den Kulturüberstand sekretiert oder in die Wirtszelle injiziert wird (13,14,90,91,93,94,253,287). Die höchste PLA/LPLA Aktivität verbleibt jedoch an der Bakterienzelle assoziiert und exponiert (94,247). Mit einem über 100-fach gesteigertem Hydrolysepotential, im Vergleich zu sekretierten lipolytischen Proteinen aus *Legionella*, wird sie durch das Enzym PlaB repräsentiert, einer Phospholipase, die keine Homologie zu bekannten bakteriellen oder auch eukaryontischen Lipasefamilien aufweist (23,94). Bisher beschriebene Familien lipolytischer Enzyme können in neun Klassen unterteilt werden, die durch konservierte Motive charakterisiert sind, welche die katalytisch wichtigen Aminosäuren einbetten (9,15). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass PlaB eine klassische katalytische Triade aus Serin, Aspartat und Histidin (Ser-85, Asp-203, His-251) ausbildet und dass deren Motive hoch konserviert in PlaB-Homologen sind. Diese Kombination aus katalytisch aktiven Aminosäuren stellt die häufigste Form eines aktiven Zentrums lipolytischer Enzyme dar, jedoch konnten bisher sowohl Triaden bestehend aus Serin, Glutamat und Histidin, als auch Diaden aus Serin und Aspartat beschrieben werden (9,231,292). Die Besonderheit von PlaB und seinen Homologen liegt, bei näherer Betrachtung der Proteine, in den die essentiellen Reste umgebenden Aminosäuren. Hier zeigt sich, dass PlaB von den bis heute bekannten Motiven, unter anderem in dem des aktiven Serins, eindeutig abweicht. Das am Weitesten verbreitete GX SXG Serinmotiv aus pro- und eukaryontischen Lipasen/Esterasen (9,142) oder auch das GD SL-Motiv der GD SL-Enzyme (282) wird in PlaB und Homologen durch THSTG repräsentiert. Hierbei ersetzt ein Threonin das für gewöhnlich an dieser Position enthaltene Glyzin. Die Notwendigkeit dieses hydrophilen Restes in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Serin konnte mittels Substitution durch Glyzin, also durch Wiederherstellung des typischen lipasebasierenden Motivs, verdeutlicht werden. Mutanten des Threoninrestes zeigten sich zu 95% in ihrer Aktivität gegenüber PLA/LPLA Substraten beeinträchtigt (s. 4.1.3). Im Gegensatz dazu wurde für die Lipase Vst aus *Vibrio harveyi* gezeigt, dass der Glyzinrest essentiell für die Entwicklung katalytischer Aktivität ist (274). Die Tatsache, dass das in vielen Lipasen essentielle Glyzin in PlaB durch eine andere Aminosäure repräsentiert

DISKUSSION

werden kann, macht PlaB und entsprechende Homologe einzigartig unter bisher beschriebenen lipolytischen Enzymen.

Da Phospholipasen mehr polare als apolare Lipidsubstrate hydrolysieren, kann angenommen werden, dass auch die aktiven Zentren dieser Enzyme entsprechend polare Aminosäuren aufweisen. Für PlaB trifft diese Hypothese bezüglich des Threoninrestes im Bereich des aktiven Serins zu. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob sich die Substitution von Thr zu Gly auch auf die Hydrolysefähigkeit von Lipidsubstraten, wie z. B. 1,2-DG oder TG, auswirkt. So ist es für SHL, einer Phospholipase A/Lipase von *Staphylococcus hyicus* beschrieben, dass die Substitution eines polaren Serinrestes durch Valin, unmittelbar neben dem aktiven Histidin, die phospholipolytischen aber nicht die ‚echten‘ lipolytischen Eigenschaften des Enzyms beeinflusst (285). Bezüglich PlaB ließ sich allerdings feststellen, dass die Hydrolyse von klassischen Lipasesubstraten durch Deletion eines polaren Restes (Threonin) nicht erhöht war, sondern das Spaltungspotential ähnlich zu den Phospholipiden eher verringert wurde.

Interessanterweise führte die Substitution von Threonin durch den hydrophoben Rest Valin, vorhanden in PlaB-Homologen aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Persephonella marina*, nur zur Alteration der Substratspezifität von PlaB. Cholinhaltige Phospho- und Lysophospholipide konnten demnach in geringerem Maße umgesetzt werden als korrespondierende Lipide mit Glyzerolresten. Ähnliche Resultate ergaben sich auch nach Substitution der Aminosäure His-7 und noch gravierender im Falle von Ser-129 (s. 4.1.3). His-7 ist zwischen PlaB und Homologen hoch konserviert und umgibt als Teil einer hydrophoben Tasche das zentrale Glyzin (IFVHGWS) des sogenannten „oxianion holes“ (142). Dieses dient der Stabilisierung des ersten tetrahedralen Übergangszustandes bei der Bildung des Azyl-Enzyme Intermediates während der Hydrolyse von Lipidsubstraten. Eine derartig strikte Konservierung des Serinrestes an Position 129 ist in PlaB-Homologen nicht gegeben. Hier tragen die Enzyme von *Psychromonas ingrahamii* und *Desulfuromonas acetoxidans* ein Glutamin an entsprechender Stelle. Warum gerade cholinkettentragende Lipide durch diese Veränderungen nicht mehr oder weitaus schlechter hydrolysiert werden können, kann nicht aufgrund chemischer Grundlagen erklärt werden. Da Glyzerolseitenketten im Lipidmolekül, wie z. B. bei DPPG oder MPLPG, nach wie vor sehr gut umgesetzt werden konnten, ist zu vermuten, dass cholinhaltige Lipide offensichtlich nicht die bevorzugten Substrate von PlaB darstellen. Denn nur kleine Veränderungen, wie in drei Fällen gezeigt, haben substantielle Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms gegenüber dieser Art von Lipidsubstraten.

DISKUSSION

Eine weitere Aminosäure, His-270, ist in PlaB in einem sogenannten HPT-Motiv lokalisiert. Dieses Motiv findet sich häufig bei GDSL-Enzymen als dasjenige, welches das aktive Histidin umgibt (43,282). Die H270N Mutante war noch immer in der Lage, im Gegensatz zu der H251N Mutante des aktiven Zentrums, entsprechende Lipide zu einem wesentlichen Prozentsatz (~10%) zu hydrolysieren. Des Weiteren ist His-270 nur in den nächsten „Verwandten“ von *L. pneumophila* konserviert, nicht aber bei homologen Proteinen außerhalb des Genus *Legionella*. Daher übernimmt dieser Rest wohl eher eine für die Konformation des PlaB-Proteins wichtige unterstützende Funktion. Lipolytische Enzyme weisen meist eine α/β -Faltung auf (192,198). Inwiefern His-270 an der Ausbildung dieser Tertiärstruktur beteiligt ist und ob sich PlaB damit von seinen Homologen und anderen Phospholipasen unterscheidet, kann nicht ohne die Aufklärung der Kristallstruktur diskutiert werden.

Das Histidin der katalytischen Triade befindet sich in dem eher kurzen Konsensusmotiv SHS (Aminosäure 250-252). Auch dieses unterscheidet sich von bisher beschriebenen Enzymen, bei welchen der aktive Rest zumeist mit hydrophoben oder amphiphilen Aminosäuren umgeben ist, so z. B. NHL, HPT, HGF oder GH (9). Anders verhält es sich dagegen mit dem Konsensusmotiv um den dritten Bestandteil des katalytischen Zentrums, dem aktiven Aspartat. Lokalisiert in der Aminosäureabfolge GSDGVV (AS 201-206), gleicht es sehr stark dem NDGL/VV-Motiv der Familie echter Lipasen (9,142). Kleine Unterschiede lassen sich hier nur in den in PlaB konservierten Resten GS (Aminosäure 201/202), die dem aktiven Aspartat vorstehen, erkennen. An Position -2, vom aktiven Aspartat aus gesehen, befindet sich in PlaB und Homologen ein konservierter Glyzinrest. Diese Position ist in anderen Lipasefamilien stark variabel. Zudem ist das in PlaB enthaltene Serin (Position -1) in anderen Enzymen häufig durch eine Aminosäure mit ähnlich polaren, hydrophilen und ungeladenen Eigenschaften, durch Asparagin ersetzt (277). Ob die die katalytisch essentiellen Aminosäuren umgebenden Seitenketten analog zu Threonin in Nachbarschaft des katalytisch aktiven Serinrestes für die Aktivität von PlaB von Bedeutung sind, wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend stellen die drei Konsensusmotive des aktiven Zentrums von PlaB und Homologen, THSTG – GSDGVV – SHS, Aminosäureabfolgen dar, die bisher noch bei keinem anderen lipolytischen Enzym beschrieben worden sind. Somit ist PlaB das erste charakterisierte Enzym einer neuen Familie bakterieller Phospholipasen (23).

5.1.2. Hydrolyse von Phosphatidylcholin als wichtiger Bestandteil der Virulenz

Die Phospholipase PlaB, Mitglied einer neuen Familie lipolytischer Enzyme, hat zumindest in *L. pneumophila* besonders starke Aktivität und kann für die exprimierende Bakterienzelle eine essentielle Rolle in der Pathogen-Wirts-Interaktion spielen. Deshalb wäre es von Interesse, ob PlaB-Homologe auch in anderen Spezies neben *L. pneumophila* von ihren Bakterienwirten als generelle Virulenzfaktoren genutzt werden können. Betrachtet man jedoch verwandte Proteine, so findet man unter den signifikanten Homologen ausschließlich putative Phospholipasen aus *P. ingrahamii*, *D. acetoxidans* und *S. pealeana* oder hypothetische Proteine aus *M. algicola*, *P. marina* und *P. aeruginosa*. Diese Spezies zeichnen sich, wie *Legionella* dadurch aus Wasserhabitats zu bevorzugen. So findet man *Psychromonas* im Polarmeer, *Persephonella* an Tiefseeschloten von Vulkanen oder *Marinobacter* in marinen Sedimenten (10,112,113). Doch nur *Marinobacter*, wie auch *Shewanella* und *Pseudomonas* Spezies wurden bereits mit eukaryonten Zellen oder Organismen, wie z. B. Dinoflagellaten, assoziiert beschrieben (113,118,165). Zudem konnten nur *Shewanella* und *Pseudomonas*, ein bedeutender Erreger nosokomialer Infektionen, bisher als Humanpathogene identifiziert werden (119,233). Die Besiedlung von eukaryontischen Organismen durch die anderen Spezies ist zwar nicht auszuschließen, doch kann unter diesen Umständen nicht angenommen werden, dass es sich bei PlaB um einen generellen Virulenzfaktor zur Kolonisierung von Wirtszellen handelt.

Bis heute ist nichts über das Lipidhydrolysespektrum der PlaB-ähnlichen Enzyme bekannt. Daher könnte PlaB bei *Legionella pneumophila*, aber nicht als Homolog einer der anderen Spezies, durch seine starke Aktivität und ein breites Lipidspektrum die Bevölkerung zusätzlicher Nischen, wie z. B. die der Lungenmakrophagen im Infektionsversuch des Meerschweinchens, unterstützen (s. 4.3.5.1). Erste Hinweise in diese Richtung ergaben Untersuchungen zum Vorkommen von PlaB-ähnlichen Enzymen in einer Reihe nicht-*pneumophila Legionella* Spezies. Hierbei stellte sich heraus, dass starke zell-assoziierte PLA/LPLA sowohl bei *L. gormanii* als auch bei *L. spiritensis* nachzuweisen war (s. 4.2.2, (23)). Das Protein von *L. spiritensis* wurde in dieser Arbeit näher untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass zwar das Hydrolysepotential gegenüber glyzerolhaltigen Phospholipiden zu dem von *L. pneumophila* Corby PlaB vergleichbar war, Lipide mit Cholinseitenketten jedoch weitaus weniger durch *L. spiritensis* PlaB hydrolysiert wurden (s. 4.2.2.2). Da *L. spiritensis* PlaB zu 94% homolog zu PlaB aus *L. pneumophila* ist, unterstreichen die Ergebnisse erneut, dass die PC-abhängige Hydrolyse eine, wenn auch fragile, Besonderheit des PlaB-Enzyms aus *L. pneumophila* darstellt. Interessanterweise ist

keine der hier für die Substratspezifität wichtig befundenen Aminosäuren (His-7, Thr-83, Ser-129) in PlaB aus *L. spiritensis* verändert. Dies lässt auf weitere essentielle Aminosäuren schließen, die für die leicht inhibierbare Fähigkeit, cholinkettige Lipide zu spalten, von Bedeutung sind.

Es stellt sich dabei die Frage, ob und in wie weit die Fähigkeit, Phosphatidylcholin zu hydrolysieren, als wichtiger Bestandteil bakterieller Virulenz angesehen werden kann. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit experimentell beantwortet werden. Es wurde sowohl für PlaB aus *L. pneumophila* Corby als auch für *L. spiritensis* PlaB gezeigt, dass ein reduziertes Potential an PC-Hydrolyse mit reduzierter Fähigkeit, humane Erythrozyten zu lysieren, korreliert. Das ist insoweit schlüssig, da Phosphatidylcholin den hauptsächlichen Bestandteil der äußeren Phospholipidschicht von eukaryontischen Plasmamembranen darstellt (73). Doch nicht nur die Plasmamembran ist mit einem hohen Anteil an PC ausgestattet. Die „oberflächenaktive Substanz“ (*surface active agent* = surfactant) der menschlichen Lunge wird von alveolären Typ II Pneumozyten sekretiert und besteht zu ~90% aus Lipiden, von denen wiederum der Hauptanteil durch Phosphatidylcholin repräsentiert wird (130,222). So vermittelt die PC-spezifische Aktivität einen zusätzlichen Vorteil für *L. pneumophila*, sich eventuell besonders im Infektionsprozess humaner Atemwege zu behaupten, denn bei *in vitro* Infektionen von *A. castellanii* Amöben und U937 Makrophagenzellen konnte keine Notwendigkeit des PlaB-Enzyms nachgewiesen werden (94). Mit Sicherheit ist PlaB nicht als alleiniger, zellzerstörender Virulenzfaktor anzusehen, doch interessanterweise konnten Humaninfektionen von nicht-*pneumophila* Stämmen mit verringertem PC-Hydrolysepotential nur in seltenen Fällen für *L. gormanii* und noch nicht für *L. spiritensis* beschrieben werden (82,114,187).

5.2. Die Bedeutung von PlaB für *Legionella pneumophila*

Die Infektionsstudien am Meerschweinchenmodell zeigen, dass PlaB eine Rolle in der Virulenz von *L. pneumophila* spielt (s. 4.3.5.1). Ähnliche Beispiele sind für eine Vielzahl von bakteriellen, lipolytischen Pathogenitätsfaktoren beschrieben (s. Einleitung). Eine PLA/LPLA aus *P. aeruginosa*, ExoU, eingebracht in einen nicht-zytotoxischen *Pseudomonas aeruginosa* Stamm, reduzierte die letale Dosis einer BALB/c Maus-Infektion um das 39-fache der ursprünglichen LD₅₀ Menge (5). Im humanen System zeigte jedoch eine Reihe an klinischen Isolaten eine Deletion des ExoU-kodierenden Gens (131). Gesteigerte Virulenz hingegen korrelierte direkt mit der Sekretion des ExoU Proteins, wie es bei Patientenisolaten mit krankenhauserworbenen Pneumonien beobachtet werden konnte (244). Dieser offensichtlich

wertvolle, aber nicht essentielle Vorteil des Erregers, entsprechende Phospholipasen zu exprimieren, könnte auch auf PlaB aus *L. pneumophila* zutreffen. Bei der Überprüfung der Verbreitung von PlaB in klinischen Isolaten konnte festgestellt werden, dass zell-assoziierte PLA/LPLA Aktivität in allen getesteten Patientenproben und in einem Umweltisolat vorhanden war (s. 4.2.1). Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme, dass PlaB von wertvollem Nutzen für ein erfolgreiches Überleben der Bakterien auch im humanen Wirt sein kann. Ob sich die PlaB-abhängige Aktivität, besonders auch die PC-hydrolysierenden Eigenschaften, gegen die Eukaryontenzelle oder gar gegen Bakterienzellen richtet, wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.2.1. PlaB als Werkzeug für verbesserte Umgebungs- und/oder Wirtsadaptation

PlaB als membranverankerte Phospholipase von *Legionella pneumophila* (247) kann mittels ihrer hydrolytischen Eigenschaften sowohl auf die Wirtszelle als auch auf die bakterielle Zelle Einfluss nehmen. Die Inhibition der Phago-Lysosomfusion im endozytischen Netzwerk ermöglicht Legionellen in einer spezialisierten Vakuole zu replizieren (267). Diese zeichnet sich unter anderem durch die Abwesenheit eines für die Phagosomenreifung wichtigen Phospholipids aus, dem Phosphatidylserin (PS) (307). Dieses Lipid, welches ~9% des Gesamtlipidbestands des Phagosoms ausmacht (72), verleiht der Vakuolenoberfläche unter Normbedingungen eine negative Gesamtladung, essentiell für die Rekrutierung kationischer Signalmoleküle und die weitere Reifung im Degradationsweg. Der hohe Anteil an PS in der Phagosomenmembran wird unter Normalbedingungen durch die ständige Verschmelzung mit Endosomen aufrechterhalten (307). Legionellen könnten daher mittels direkter PS-Degradation durch eine Phospholipase oder durch Störung des Vesikelverkehrs zu der Reduktion an PS in der Phagosomenmembran beitragen. Die aktive Veränderung der umgebenden Vakuolenmembran zur Aufrechterhaltung der Replikationsnische wurde schon für die Glyzerophospholipid:Cholesterol Azytransferase SseJ aus *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium beschrieben. Es wird angenommen, dass akkumuliertes Cholesterol durch SseJ verestert und somit die Dynamik der umgebenden Vakuolenmembran beeinflusst wird (53,193). Ob ähnliche Aktivitäten in Bezug z. B. auf PS-Degradation auch von *L. pneumophila* PlaB ausgeübt werden können, ist bisher noch nicht bekannt. Zwar ist PlaB in der Lage, PS in hohem Maße umzusetzen (s. 4.1.1.3), doch zeigen *in vitro* Infektionen der *plaB* Mutante keinen Replikationsdefekt, wie z. B. die der *Salmonella sseJ* Mutante (197). Eine Kompensation durch die Hochregulation einer der anderen 16 bisher bekannten Phospholipasen nach *plaB* Deletion ist jedoch nicht auszuschließen. Somit ist es denkbar, dass

DISKUSSION

PlaB an der Vakuolenmembran substantielle Veränderungen vornimmt und/oder auch lipidbasierende Signalmoleküle freisetzt, um der Pathogenabwehr des Wirtes entgegenzuwirken (s. 5.2.2).

Neben einem möglichen Einfluss auf die Wirtszelle kann eine zell-assoziierte Phospholipase auch die eigene bakterielle Membran verändern, um eine erfolgreiche Anpassung an veränderte Umweltbedingungen zu erreichen. Dieser Mechanismus ist für OMPLA von *H. pylori* zur Anpassung an das saure Milieu im Magen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass ein reduzierter pH-Wert zur Aktivierung dieser Phospholipase führt, welche unmittelbar danach den Membrananteil an Lysophospholipiden von <2% auf >50% erhöht (272,273). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob PlaB die Überlebensfähigkeit und/oder die Membranzusammensetzung der Bakterien unter verschiedenen Wachstumsbedingungen beeinflusst. Dies konnte bei keinem der getesteten Ansätze nachgewiesen werden. Das Wachstumsverhalten der *plaB* Mutante glich dem des Wildtyps. Die durch dünnschichtchromatographische und FT-IR Analyse bestimmte Membranzusammensetzung zeigte keine Differenzen. Ein Unterschied konnte jedoch bei Erniedrigung des pH-Wertes festgestellt werden. Die Reduktion des Wachstums der *plaB* Mutante konnte bei weiterer Erniedrigung des pH-Wertes noch verstärkt werden, war jedoch bei den verwendeten Stämmen gegenläufig, d. h. der *plaB*- Stamm aus *L. pneumophila* 130b zeigte den Defekt, der des Stammes Corby wies diesen nicht auf. Die Membranzusammensetzung unterschied sich in keinem der Fälle von der des Wildtyps. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die reduzierte Überlebensrate auf einen anderen Faktor und nicht auf PlaB zurückzuführen ist. Zudem besteht für den Lebenszyklus der Legionellen nur im späteren Verlauf der Replikation die Notwendigkeit, sich an ein saurehaltiges Milieu anzupassen, da sie zuerst, wie bereits erwähnt, die Ansäuerung ihres Replikationskompartimentes nach erfolgter Phagozytose verhindern (138).

Die Fähigkeit, in der Umwelt oder auch während einer Humaninfektion toxische Stoffe zu spalten, kann für ein Bakterium von wesentlicher Bedeutung sein. Legionellen sehen sich nach Inhalation in die Alveolen der ersten Abwehrkomponente gegenüber, dem Lungensurfactant. Einwirkende Phospholipasen generieren bei der Zerstörung dieser Schutzschicht eine Menge an toxischen Lysophospholipiden. Diese hydrolytischen Abbauprodukte können nicht nur gegen die Wirtszelle, sondern auch gegen die Bakterienzelle wirken, indem sie in die Zielmembran interkalieren, die Membranorganisation stören und permeabilisieren, bis eine osmotische Lyse der Zelle eintritt (215,298). Daher kann es als Vorteil angesehen werden, Lysophospholipaseaktivitäten zum Abbau der toxischen Produkte

zu synthetisieren. Insgesamt sind 15 der 17 bekannten phospholipolytischen Enzyme aus *Legionella* mit dieser Funktion ausgestattet (13). Interessanterweise konnten für das GDSL-Enzym PlaA bereits detoxifizierende Eigenschaften beschrieben werden (93). Da die Aktivität von PlaA im Vergleich zu PlaB relativ gering ist, wurde in dieser Arbeit der Beitrag von PlaB zur Spaltung toxischer Stoffe und somit zur Überlebensfähigkeit untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass das Enzym unter den getesteten Bedingungen nicht zur Abwehr dieser Substanzen eingesetzt wird.

5.2.2. Veränderung der zellulären Immunantwort als Mechanismus für gesteigerte Virulenz

Phospholipasen sind nicht nur zellzerstörende Enzyme, sondern können vielmehr durch Generierung von Lipidsignalmolekülen Einfluss auf die Signalweiterleitung der Wirtszellkommunikation nehmen. Dies konnte schon für eine Reihe von lipolytisch aktiven Proteinen gezeigt werden. *C. perfringens* α -toxin, eine Phospholipase C, induziert die Expression von ELAM-1, ICAM-1 und IL-8 wie auch die der gefäßverändernden (vasoaktiven) Lipide Prostazyklin und PAF (*platelet-activating factor*), einem Thrombozytenaktivator, zur Störung der Homöostase im zellulären Gefäßsystem bei Wundinfektionen (45,65). Gleichermäßen wurde für ExoU von *P. aeruginosa* die Induktion von IL-8 und die Anreicherung der Arachidonsäure zugrunde liegenden Prostaglandine PGE(2) und PGI(2) nachgewiesen (65,234). Es wird angenommen, dass dadurch die angeborene Immunantwort überstimuliert wird und, z. B. durch das Chemokin IL-8, angelockte Neutrophile so zu einer erhöhten Zellzerstörung des eigenen Gewebes beitragen. Somit ist die zytotoxische Eigenschaft mancher Phospholipasen zu einem gewissen Prozentsatz der Anregung des Immunsystems zuzuschreiben (242). Zudem kann durch Synthese von vasoaktiven Lipiden die Gefäßerweiterung gefördert werden, um letztendlich eine Ausbreitung des pathogenen Organismus im Wirtssystem zu unterstützen.

Ganz im Gegensatz dazu reprimiert β -Toxin, eine Sphingomyelinase von *S. aureus*, die Sekretion von IL-8 in TNF- α stimulierten Endothelzellen (268). Dies steht in Einklang mit der beobachteten reduzierten Chemotaxis und Adhäsion von Leukozyten bei einer Infektion mit *S. aureus* (54,66). Offensichtlich nutzt dieses Bakterium nicht die Aktivierung, sondern die Blockierung der Immunantwort zur erfolgreichen Persistenz und Replikation im Wirtsorganismus.

Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben, konnte PlaB die Sekretion des Chemoattraktants IL-8 induzieren. Dass Legionellen die Sekretion des Interleukins stimulieren, wurde bereits

experimentell belegt (103,241) und als Serummarker bakterieller Pneumonien nachgewiesen (153). Jenes Interleukin ist neben anderen Chemokinen der CXC- oder CC-Familie für die Rekrutierung von Leukozyten zum Ort des Geschehens, der Infektion, und für deren Aktivierung von großer Bedeutung (12). Das Einwandern von Neutrophilen, die zu der Klasse der polymorphkernigen Leukozyten gehören, ist ein Kennzeichen einer Infektion durch *L. pneumophila* (34,302), aber auch der anderer Pneumonieerreger (64). Doch im Gegensatz zu den meisten Lungenkeimen erweisen sich Legionellen relativ resistent gegenüber der Eliminierung durch neutrophile Zellen (139,297). Somit kann sich eine IL-8-abhängige Zellrekrutierung, vermittelt durch PlaB, positiv auf den Infektionsprozess auswirken, wenn sich die Anlockung und Aktivierung der Immunzellen gegen den Wirtsorganismus richten.

Ein Zusammenhang zwischen IL-8 Sekretion und *Legionella* virulenz- oder pathogenitäts-assoziierte Faktoren konnte auf verschiedene Weisen bestätigt werden. So zeigte sich z. B., dass die Stimulierung der IL-8 Sekretion im A549 Typ II Pneumozytenmodell bislang als DotO-abhängig, aber DotA-unabhängig, also widersprüchlich bezüglich des Typ IVB Sekretionssystem ist (241,276). Weiterhin wurde beschrieben, dass Neutrophileninflux im murinen Modell der Legionelleninfektion von der Expression des Toll-like Rezeptors 2 (TLR2) abhängig ist (102). TLR bezeichnet eine Familie membranständiger Rezeptoren, die unterschiedliche pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* = PAMPs) erkennen und mittels Signaltransduktion eine entsprechende Immunantwort einleiten (147). TLR2 wurde bisher als Rezeptor für die Bindung von Lipoteichonsäuren und peptidoglycan-assoziierten Lipoproteinen beschrieben (243,251). Neuesten Erkenntnissen zur Folge zeichnet sich TLR2 jedoch auch durch die Erkennung des bakteriellen Lipopolysaccharides (LPS) aus (80,109). Als membranständige Phospholipase wurde PlaB in dieser Arbeit auf den Einfluss der LPS-Zusammensetzung überprüft. Dieser Zucker-Lipid-Komplex wurde bereits experimentell als potenter Stimulator der Immunantwort im Menschen im Zusammenhang mit Infektionen der Lunge beschrieben (134). Hierbei zeigte sich, dass *E. coli* LPS-Inokkulation die Ausschüttung der chemoattraktiven Faktoren IL-8 und MCP-1 fördert und somit Neutrophile und Makrophagen zum Infektionsherd lockt und aktiviert. Die gezeigte PlaB-abhängige IL-8 Sekretion konnte jedoch als unabhängig von LPS-Modifikationen eingestuft werden, da in ELISA-Studien als auch in vergleichender SDS-PAGE Analyse im LPS-Profil kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *plaB* Mutante festzustellen war.

Im Weiteren wurde noch der Zusammenhang zwischen Flagellenexpression und nachfolgender Induktion der IL-8 Sekretion nach *L. pneumophila* Infektion humaner

DISKUSSION

Lungenepithelzellen diskutiert (241). Jedoch zeigte die in dieser Arbeit durchgeführte Flagellenmikroskopie, ähnlich den oben erwähnten LPS-Studien, keinen Unterschied zwischen Wildtyp und der *plaB* Mutante. Damit ist eine indirekte Beeinträchtigung der Membran und des Motilitätssystems durch PlaB als Wirkmechanismus bzw. als Signalmolekül eher zu vernachlässigen. Dies wirft die Frage nach einem anderen PAMP oder einem Botenstoff zur Stimulierung der Zytokininduktion auf. Die Aktivität von PlaB gegenüber Phospholipiden führt zur Abspaltung einer oder mehrerer Fettsäuren und zur Generierung von Lysophospholipiden. Die Arachidonsäure, die am häufigsten vertretene Fettsäure an *sn2*-Position eukaryontischer Phospholipide, und deren Derivat Prostaglandin E₂ (PGE₂) wie auch Lysophosphatidsäure (LPA) und Lysophosphatidylcholin (LPC) repräsentieren putative Signalmoleküle und konnten bereits als Induktoren der IL-8 Expression beschrieben werden (17,101,219,269,309). In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass A549 Lungenepithelzellen durch Stimulation mittels einer 25µM LPC-, nicht aber einer gleichmolaren LPA-Suspension, das Chemoattraktant in den Kulturüberstand sekretieren (s. 4.3.6.2). Im Lipidhydrolysespektrum von PlaB zeigte sich, dass das Enzym LPC, und somit ein putatives Signalmolekül, durch Spaltung von PC generieren kann (s. 4.1.1.3 und (94)). Ob auch Phosphatidsäure (PA) von PlaB hydrolysiert wird, wurde experimentell nicht untersucht, jedoch ist dieses Lipid nicht als häufiger Vertreter in Membranen anzusehen. Es ist daher wahrscheinlicher, sollte LPA an der Signalweiterleitung zur IL-8 Sekretion nach Legionelleninfektion beteiligt sein, dass durch PlaB generierte Lysophospholipide (LPLs) durch endogene Lysophospholipasen D (lysoLPD) gespalten und auf diesem Wege LPA zur Verfügung gestellt wird.

LPA vermittelte IL-8 Sekretion ist in humanen bronchial Epithelzellen sowohl auf die Aktivierung des p38 MAPK/NF-κB Weges als auch auf die Aktivierung des JNK-induzierten AP-1 Transkriptionsfaktors zurückzuführen (232). Ebenso konnte LPC als Stimulator der JNK/AP-1 Kaskade beschrieben werden (83). Interessanterweise wurde ExoU, einer PLA/LPLA, die Aktivierung des JNK/AP-1 Signalweges und die dadurch abhängige Sekretion des Chemokins IL-8 nachgewiesen, wenn auch das Signalmolekül bislang noch nicht identifiziert werden konnte (65). Welche Signalwege die PlaB-vermittelte Zytokinsekretion anschaltet, unterliegt Vermutungen. Legionellen-induzierte IL-8 Sekretion ist bisher über die Aktivierung des NF-κB-Signalweges beschrieben (103,276). Dieser kürzlich als 2-phasiges Translokationsereignis beschriebene Weg wird in erster Instanz durch Flagellin, in zweiter durch die Fähigkeit der bakteriellen Replikation bestimmt (19). Untersuchungen der *plaB* Mutante zeigten bei dem beschriebenen Experiment keinen

DISKUSSION

Unterschied zur NF- κ B Nukleustranslokation des Wildtyps (Bartfeld, unveröffentlichte Daten), jedoch ist dies durch den bestätigten Replikationsdefekt *in vivo* nicht auszuschließen. Ebenso ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob synergistisch zum NF- κ B-Weg andere Transkriptionsfaktoren, wie z. B. AP-1 im Falle von ExoU, oder allgemein nach *Pseudomonas* Stimulation humaner Bindehautepithelzellen auch CCAAT/enhancer-binding Protein β (C/EBP β) an der Zytokinantwort in Bezug auf IL-8 beteiligt sind (65,291). Der Zusammenhang zwischen IL-8 Sekretion und der Aktivierung von AP-1 nach Legionelleninfektion wird zwar von *Teruya et al.* dementiert, ist in deren experimentellen Ausführungen aber nicht eindeutig auszuschließen (276).

Ein ähnliches Prinzip der Zellrekrutierung und Aktivierung zur systematischen Zerstörung des umgebenden Gewebes kann der Sekretion der CC-Chemokine RANTES und MCP-1 zugrunde liegen (s. 4.3.6.1). Im Unterschied zu IL-8 ist MCP-1 chemotaktisch für Monozyten und für deren Initiierung des sogenannten ‚respiratorischen Burst‘, der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zur Eliminierung der Pathogene, verantwortlich (183). MCP-1 Sekretion nach Legionelleninfektion humaner A549 Zellen wurde, zumindest zum Teil, als abhängig von der p38 MAPK-Signalkaskade beschrieben (241). Das letzte der drei PlaB-induzierten Chemokine RANTES wiederum ist höchst effektiv in der Rekrutierung und Ausschüttung der, basische Proteine enthaltenen, Granula von basophilen und eosinophilen Leukozyten (224). Diese Zellformen spielen jedoch eine eher untergeordnete Rolle in der Legionellen-induzierten Immunantwort, die hauptsächlich sowohl im humanen als auch im Mäuse- oder Meerschweinchenmodell durch polymorphkernige Neutrophile und Makrophagenzellen vermittelt wird (34,146,302).

Bisher nicht untersucht ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der TIMP-2 Expression nach Legionelleninfektion der Zelllinie A549. TIMP-2 inhibiert, als multifunktionales Protein, in erster Linie matrixdegradierende Metalloproteinasen (MMPs), die eine Vielzahl an Funktionen in der Embryonalentwicklung, der Organmorphogenese und der Wundheilung übernehmen (33). Ein Ungleichgewicht zwischen den MMPs und ihren Inhibitoren kann in signifikanten Gewebszerstörungen und einer Vielzahl an Erkrankungen enden, so z. B. Krebs und Arthritis. Die Aktivierung von MMPs und die Senkung der TIMP-2 Expression im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen wurden bisher nur in Einzelfällen beschrieben. So reduzierten mit *E. coli* LPS stimulierte Makrophagen die Expression des Inhibitors (250). Studien zu *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, einem Erreger der Parodontitis (Entzündungen des Zahnfleischbindegewebes), zeigten zwar keine Veränderung in der TIMP-2-Menge, aber eine erhöhte Sekretion von MMPs, was wiederum als erheblicher

Beitrag zur Gewebszerstörung des Zahnhalteapparates diskutiert wurde (30). Ob und in welchem Maße Legionellen eine Induktion der Metalloproteinasen induzieren oder deren Inhibition blockieren und somit zur Zellzerstörung des infizierten Gewebes beitragen, kann ein interessanter Punkt zukünftiger Forschungsansätze sein. In dieser Arbeit wurde eine PlaB-abhängige TIMP-2 Expression nachgewiesen. Lungenepithelzellen waren in der Expression des Inhibitors nach Infektion mit der *plaB* Mutante reduziert (s. 4.3.6.1). Eine Sekretion von TIMP-2, stimuliert durch PlaB, hätte bei der oben genannten Annahme eine inhibierende Wirkung auf die Zellzerstörung und ist demnach gegenläufig zu der Stimulierung des Immunsystems durch Expression der Chemoattraktoren IL-8/MCP-1 und RANTES. Dies könnte auf eine Feinmodulation zurückzuführen sein oder auf der Tatsache beruhen, dass TIMP-2 neben der offensichtlichen Inhibition von MMPs und abhängig vom betroffenen Zelltyp gegenläufige Funktionen übernehmen kann. So wurde das Peptid als die Zellproliferation stimulierend oder hemmend, aber auch apoptosefördernd oder anti-apoptotisch wirkend beschrieben (160). Intensivere Untersuchungen, vor allem in Bezug auf die allgemeine Reduktion des TIMP-2-Levels, könnten gezielte Therapeutika hervorbringen, die die massive Zerstörung von Lungengewebszellen und die Verbreitung der Bakterien innerhalb des Organs minimieren.

5.2.3. PlaB als Bakteriozin?

PlaB zeigt hydrolytisches Potential gegenüber einem breiten Spektrum an Phospholipidsubstraten (s. 4.1.1.3). Interessanterweise wird bevorzugt Phosphatidylglycerol gespalten, ein Lipid, welches in *Legionella*, aber vor allem bei anderen bakteriellen Spezies in der Zellmembran vorliegt (201). Aus welchem Grund könnte solch eine Phospholipase für *L. pneumophila* von Bedeutung sein? Neben Protozoen als hauptsächlichen Replikationsort konnten Legionellen auch in aquatischen Biofilmen nachgewiesen werden (68,69,221). Ob sie sich darin auch extrazellulär vermehren oder sich nur in ihrem Protozoenwirt replizieren, ist bis heute umstritten, in Mikrokolonien persistierende Bakterien konnten jedoch beobachtet werden (190,221). Da sich in Biofilmen eine Vielzahl an bakteriellen Spezies befinden kann, ist es essentiell, sich gegen diese zu behaupten und/oder sich gegen diese zur Wehr zu setzen, um das eigene Wachstum und die damit verbundene Nährstoffgrundlage zu gewährleisten. Eine Möglichkeit, dies umzusetzen, kann die Zerstörung gegnerischer Membranen sein. Sekretierte Gruppe IIa Phospholipasen A_2 aus Säugetieren sind weitläufig für ihre bakteriziden Eigenschaften bekannt (20,47,151). Sie sind aufgrund ihrer stark kationischen Natur (humane gIIa PLA₂ = pI>10.5) in der Lage, die negativ geladenen Membranen Gram

DISKUSSION

positiver Bakterien zu passieren, benötigen jedoch für die Penetration Gram negativer Zellwände zusätzlich den Einsatz eines bakterizid/permeabilisierung-steigernden Proteins BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*) (47). Zudem weisen diese Enzyme eine hohe Affinität für anionische Lipidmembranen auf, wie sie in Bakterien zu finden ist und weniger für die zwitterionischen Membranen der eigenen eukaryontischen Zelle. PlaB zeigt zumindest ansatzweise Potential eine solche Rolle einzunehmen. So wird z. B., wie bereits erwähnt, vorwiegend das anionische Lipid PG hydrolysiert. Die Gegenüberstellung der positiv geladenen Lysin-, Arginin- und Histidin- zu negativen Aspartat- und Glutamatresten resultiert in einer Nettogesamtladung für PlaB von +16 (humane gIIa PlaA₂ = +19) und damit theoretisch in der Fähigkeit, anionische Membranen passieren zu können. Bisher ist jedoch noch kein Beispiel einer PLA aus Bakterien als Abwehrmechanismus im mikrobiologisch sozialen Umfeld bekannt. Des Weiteren sind die bakteriziden Phospholipasen von Säugetierzellen sekretierten Ursprungs und nicht, wie PlaB, zell-assoziiierter Natur. PlaB konnte bisher nur an der äußeren Membran lokalisiert werden (247). Dies schließt jedoch eine mögliche Sekretion über das Abschnüren von Vesikeln der äußeren Membran, sogenannten OMVs (*outer membrane vesicles*), nicht aus. Diese Art der Sekretion umfasst sowohl LPS und Phospholipide als auch Proteine der äußeren Membran und des Periplasmas und wird von Bakterien zur Überbringung von Virulenzfaktoren aber auch zur Kommunikation innerhalb einer Kolonie über „*quorum sensing*“ genutzt (31,156,175). Die Übermittlung einer Phospholipase über OMVs könnte als Übertragungsweg für PlaB in Frage kommen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Vesikel aus *L. pneumophila* lipolytische Aktivität besitzen (103). Bisher war es allerdings weder möglich, PlaB in OMVs zu detektieren (103), noch bakterizide Eigenschaften des Enzyms nachzuweisen. Daher bleibt die Frage nach der spezifischen Funktion des Lipidsubstratspektrums für weitere Forschungsansätze offen.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine neue Familie lipolytischer Enzyme begründet werden. PlaB, als erster näher charakterisierter Vertreter, weist ein breites Lipidsubstratspektrum mit der Besonderheit auf, durch Phosphatidylcholinhydrolyse erhebliche zytotoxische Eigenschaften erworben zu haben. Tatsächlich zeigte sich im Tiermodell, dass PlaB einen erheblichen Einfluss auf das Virulenzpotential der Bakterien hat. Neben zytolytischer Aktivität könnte die Generierung von Signalmolekülen auf Lipidbasis und die damit veränderte Immunantwort ein Teil der von PlaB-vermittelten Virulenz darstellen. Da sich in *in vitro* Infektionen von Makrophagen aber auch von Amöben kein Replikationsdefekt der

DISKUSSION

plaB Mutante nachweisen ließ, ist das Enzym trotz stärkster Aktivität nur als ein Bestandteil einer großen Anzahl lipolytischer Faktoren zu sehen, die für das Überleben von Legionellen in ihrem Wirt aber auch der Umwelt von Nutzen sein könnten.

6 Ausblick

Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte, ist die zell-assoziierte Phospholipase PlaB ein stark reaktives Enzym mit Substratspezifitäten für vorwiegend negativ geladene Phospholipide. Interessanterweise enthalten z. B. *E. coli* und *B. subtilis*, aber auch *A. castellanii* einen erheblichen Anteil negativ geladener Phospholipide in ihren Membranen. So könnten zum einen fluoreszenzmarkierte Phospholipide eukaryonter Zellen Aufschluss über die tatsächlichen Aktivitäten des Enzyms an der Wirtszellmembran während einer Legionelleninfektion geben. Zum anderen sollte eine putative Bakteriozinfunktion in weiterführenden Biofilmbioexperimenten durchgeführt werden. Informationsreich wäre hierbei die Zugabe gereinigten PlaB Proteins. Daher sollten weitere Expressionssysteme, z. B. in *B. subtilis*, näher untersucht werden. Gereinigtes PlaB könnte im Folgenden auf Stabilität unter verschiedenen Bedingungen getestet werden, da reaktive Lipasen/Phospholipasen auch biotechnologische Anwendung finden können.

Ein weiterer interessanter Punkt kann die Untersuchung von Phospholipaseinhibitoren an PlaB darstellen. Eine neuartige Familie lipolytischer Faktoren, die keine Homologie zu humanen Phospholipasen besitzt, könnte durch besondere Ausbildung der katalytischen Zentren spezifisch inhibiert werden. Ein solcher Vorgang würde neben Experimenten an Wildtyp und Mutante oder gereinigtem PlaB die Kristallisation und Begutachtung der speziellen dreidimensionalen Struktur erfordern. Da es während der Legionärserkrankung zu immenser Zellzerstörung kommt, könnte so durch gezielte Therapie der bakterielle Beitrag zur Zytolyse vermindert werden.

Neben der Zellzerstörung können auch vermehrt Signalmoleküle auf Lipidbasis generiert werden. Wie in der Arbeit beschrieben, könnte die Aufklärung des Signalweges der PlaB-vermittelten Chemokinsekretion wesentlich zum Verständnis der molekularen Abläufe während eines Infektionszyklus beitragen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Legionellen die TIMP-2 Sekretion negativ regulieren. Dies ist ein völlig neuer Aspekt der zellulären Immunantwort auf eine Pathogeninteraktion. Da *in vitro* Versuche starken Schwankungen unterlagen, sollte der tatsächliche Beitrag von PlaB zur beobachteten Zytokinausschüttung *in vivo* durch real-time RT-PCR bestätigt werden.

Wie dargestellt, weist PlaB einen verlängerten C-terminalen Bereich auf. Da dieser neben dem Beitrag zur Aktivität des Enzyms noch weitere Funktionen, wie z. B. eine Sekretionsfunktion, übernehmen könnte, sollte dessen Relevanz für das zytotoxische Protein weiter untersucht werden.

7 Literaturverzeichnis

1. *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2008*. Robert Koch-Institut.
2. Adeleke, A. A., B. S. Fields, R. F. Benson, M. I. Daneshvar, J. M. Pruckler, R. M. Ratcliff, T. G. Harrison, R. S. Weyant, R. J. Birtles, D. Raoult, and M. A. Halablab. 2001. *Legionella drozanskii* sp. nov., *Legionella rowbothamii* sp. nov. and *Legionella fallonii* sp. nov.: three unusual new *Legionella* species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:1151-1160.
3. Akamine, M., F. Higa, N. Arakaki, K. Kawakami, K. Takeda, S. Akira, and A. Saito. 2005. Differential roles of Toll-like receptors 2 and 4 in *in vitro* responses of macrophages to *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **73**:352-361.
4. Akoh, C. C., G. C. Lee, Y. C. Liaw, T. H. Huang, and J. F. Shaw. 2004. GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog. Lipid Res.* **43**:534-552.
5. Allewelt, M., F. T. Coleman, M. Grout, G. P. Priebe, and G. B. Pier. 2000. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect. Immun.* **68**:3998-4004.
6. Alli, O. A., L. Y. Gao, L. L. Pedersen, S. Zink, M. Radulic, M. Doric, and K. Y. Abu. 2000. Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **68**:6431-6440.
7. Amer, A., L. Franchi, T. D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozoren, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, and G. Nunez. 2006. Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* **281**:35217-35223.
8. Andrews, D. L., B. Beames, M. D. Summers, and W. D. Park. 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector. *Biochem. J.* **252**:199-206.
9. Arpigny, J. L. and K. E. Jaeger. 1999. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem. J.* **343** Pt 1:177-183.
10. Auman, A. J., J. L. Breezee, J. J. Gosink, P. Kampfer, and J. T. Staley. 2006. *Psychromonas ingrahamii* sp. nov., a novel gas vacuolate, psychrophilic bacterium isolated from Arctic polar sea ice. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:1001-1007.
11. Awad, M. M., A. E. Bryant, D. L. Stevens, and J. I. Rood. 1995. Virulence studies on chromosomal alpha-toxin and theta-toxin mutants constructed by allelic exchange provide genetic evidence for the essential role of alpha-toxin in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene. *Mol. Microbiol.* **15**:191-202.
12. Baggiolini, M., P. Loetscher, and B. Moser. 1995. Interleukin-8 and the chemokine family. *Int. J. Immunopharmacol.* **17**:103-108.
13. Banerji, S., P. Aurass, and A. Flieger. 2008. The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**:169-181.
14. Banerji, S., M. Bewersdorff, B. Hermes, N. P. Cianciotto, and A. Flieger. 2005. Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **73**:2899-2909.
15. Banerji, S. and A. Flieger. 2004. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? *Microbiology* **150**:522-525.

LITERATURVERZEICHNIS

16. **Banga, S., P. Gao, X. Shen, V. Fiscus, W. X. Zong, L. Chen, and Z. Q. Luo.** 2007. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**:5121-5126.
17. **Barekzi, E., J. Roman, K. Hise, S. Georas, and J. W. Steinke.** 2006. Lysophosphatidic acid stimulates inflammatory cascade in airway epithelial cells. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **74**:357-363.
18. **Barker, A. P., A. I. Vasil, A. Filloux, G. Ball, P. J. Wilderman, and M. L. Vasil.** 2004. A novel extracellular phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* is required for phospholipid chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **53**:1089-1098.
19. **Bartfeld, S., C. Engels, B. Bauer, P. Aurass, A. Flieger, H. Bruggemann, and T. F. Meyer.** 2009. Temporal resolution of two-tracked NF-kappaB activation by *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **11**:1638-1651.
20. **Beers, S. A., A. G. Buckland, R. S. Koduri, W. Cho, M. H. Gelb, and D. C. Wilton.** 2002. The antibacterial properties of secreted phospholipases A2: a major physiological role for the group IIA enzyme that depends on the very high pI of the enzyme to allow penetration of the bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.* **277**:1788-1793.
21. **Bellinger-Kawahara, C. and M. A. Horwitz.** 1990. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. *J. Exp. Med.* **172**:1201-1210.
22. **Bender, J. and A. Flieger.** 2009. Lipases as Pathogenicity Factors of Bacterial Pathogens of Humans. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds.* p. 3241-3258. Timmis, Kenneth N (ed.). Springer.
23. **Bender, J., K. Rydzewski, M. Broich, E. Schunder, K. Heuner, and A. Flieger.** 2009. Phospholipase PlaB of *Legionella pneumophila* represents a novel lipase family: protein residues essential for lipolytic activity, substrate specificity, and hemolysis. *J. Biol. Chem.* **284**:27185-27194.
24. **Benkel, D. H., E. M. McClure, D. Woolard, J. V. Rullan, G. B. Miller, Jr., S. R. Jenkins, J. H. Hershey, R. F. Benson, J. M. Pruckler, E. W. Brown, M. S. Kolczak, R. L. Hackler, B. S. Rouse, and R. F. Breiman.** 2000. Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *Int. J. Epidemiol.* **29**:1092-1098.
25. **Benson, R. F. and B. S. Fields.** 1998. Classification of the genus *Legionella*. *Semin. Respir. Infect.* **13**:90-99.
26. **Berger, K. H., J. J. Merriam, and R. R. Isberg.** 1994. Altered intracellular targeting properties associated with mutations in the *Legionella pneumophila dotA* gene. *Mol. Microbiol.* **14**:809-822.
27. **Bi, W. and P. J. Stambrook.** 1998. Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal. Biochem.* **256**:137-140.
28. **Bleed, D. M.** 2001. Worldwide epidemiology of tuberculosis. *Pediatr. Pulmonol. Suppl* **23**:60.
29. **BLIGH, E. G. and W. J. DYER.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* **37**:911-917.
30. **Bodet, C., E. Andrian, S. Tanabe, and D. Grenier.** 2007. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J. Cell Physiol* **212**:189-194.
31. **Bomberger, J. M., D. P. Maceachran, B. A. Coutermarsh, S. Ye, G. A. O'Toole, and B. A. Stanton.** 2009. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000382.

LITERATURVERZEICHNIS

32. **Brennan, P. J. and H. Nikaido.** 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29-63.
33. **Brew, K., D. Dinakarpanian, and H. Nagase.** 2000. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**:267-283.
34. **Brieland, J., P. Freeman, R. Kunkel, C. Chrisp, M. Hurley, J. Fantone, and C. Engleberg.** 1994. Replicative *Legionella pneumophila* lung infection in intratracheally inoculated A/J mice. A murine model of human Legionnaires' disease. *Am. J. Pathol.* **145**:1537-1546.
35. **Brieland, J., M. McClain, L. Heath, C. Chrisp, G. Huffnagle, M. LeGendre, M. Hurley, J. Fantone, and C. Engleberg.** 1996. Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease. *Infect. Immun.* **64**:2449-2456.
36. **Brieland, J. K., L. A. Heath, G. B. Huffnagle, D. G. Remick, M. S. McClain, M. C. Hurley, R. K. Kunkel, J. C. Fantone, and C. Engleberg.** 1996. Humoral immunity and regulation of intrapulmonary growth of *Legionella pneumophila* in the immunocompetent host. *J. Immunol.* **157**:5002-5008.
37. **Brieland, J. K., C. Jackson, S. Hurst, D. Loebenberg, T. Muchamuel, R. Debets, R. Kastelein, T. Churakova, J. Abrams, R. Hare, and A. O'Garra.** 2000. Immunomodulatory role of endogenous interleukin-18 in gamma interferon-mediated resolution of replicative *Legionella pneumophila* lung infection. *Infect. Immun.* **68**:6567-6573.
38. **Brieland, J. K., D. G. Remick, P. T. Freeman, M. C. Hurley, J. C. Fantone, and N. C. Engleberg.** 1995. In vivo regulation of replicative *Legionella pneumophila* lung infection by endogenous tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. *Infect. Immun.* **63**:3253-3258.
39. **Broich, M., K. Rydzewski, T. L. McNealy, R. Marre, and A. Flieger.** 2006. The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32. *J. Bacteriol.* **188**:1218-1226.
40. **Broome, C. V. and D. W. Fraser.** 1979. Epidemiologic aspects of legionellosis. *Epidemiol. Rev.* **1**:1-16.
41. **Bruggemann, H., C. Cazalet, and C. Buchrieser.** 2006. Adaptation of *Legionella pneumophila* to the host environment: role of protein secretion, effectors and eukaryotic-like proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:86-94.
42. **Bruggemann, H., A. Hagman, M. Jules, O. Sismeiro, M. A. Dillies, C. Gouyette, F. Kunst, M. Steinert, K. Heuner, J. Y. Coppee, and C. Buchrieser.** 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **8**:1228-1240.
43. **Brumlik, M. J. and J. T. Buckley.** 1996. Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* **178**:2060-2064.
44. **Bryant, A. E., R. Y. Chen, Y. Nagata, Y. Wang, C. H. Lee, S. Finegold, P. H. Guth, and D. L. Stevens.** 2000. Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *J. Infect. Dis.* **182**:808-815.
45. **Bryant, A. E. and D. L. Stevens.** 1996. Phospholipase C and perfringolysin O from *Clostridium perfringens* upregulate endothelial cell-leukocyte adherence molecule 1 and intercellular leukocyte adherence molecule 1 expression and induce interleukin-8 synthesis in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**:358-362.
46. **Brzozowski, A. M., U. Derewenda, Z. S. Derewenda, G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Huge-Jensen, S. A. Patkar, and L. Thim.** 1991. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* **351**:491-494.

LITERATURVERZEICHNIS

47. **Buckland, A. G. and D. C. Wilton.** 2000. The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). *Biochim. Biophys. Acta* **1488**:71-82.
48. **Bukholm, G., T. Tannaes, P. Nedenskov, Y. Esbensen, H. J. Grav, T. Hovig, S. Ariansen, and I. Guldvog.** 1997. Colony variation of *Helicobacter pylori*: pathogenic potential is correlated to cell wall lipid composition. *Scand. J. Gastroenterol.* **32**:445-454.
49. **Bunting, M., D. E. Lorant, A. E. Bryant, G. A. Zimmerman, T. M. McIntyre, D. L. Stevens, and S. M. Prescott.** 1997. Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J. Clin. Invest* **100**:565-574.
50. **Burch, R. M., A. L. Ma, and J. Axelrod.** 1988. Phorbol esters and diacylglycerols amplify bradykinin-stimulated prostaglandin synthesis in Swiss 3T3 fibroblasts. Possible independence from protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**:4764-4767.
51. **Burstein, D., T. Zusman, E. Degtyar, R. Viner, G. Segal, and T. Pupko.** 2009. Genome-scale identification of *Legionella pneumophila* effectors using a machine learning approach. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000508.
52. **Byrne, B. and M. S. Swanson.** 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infect. Immun.* **66**:3029-3034.
53. **Catron, D. M., M. D. Sylvester, Y. Lange, M. Kadekoppala, B. D. Jones, D. M. Monack, S. Falkow, and K. Haldar.** 2002. The *Salmonella*-containing vacuole is a major site of intracellular cholesterol accumulation and recruits the GPI-anchored protein CD55. *Cell Microbiol.* **4**:315-328.
54. **Chavakis, T., M. Hussain, S. M. Kanse, G. Peters, R. G. Bretzel, J. I. Flock, M. Herrmann, and K. T. Preissner.** 2002. *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nat. Med.* **8**:687-693.
55. **Chayakulkeeree, M., T. C. Sorrell, A. R. Siafakas, C. F. Wilson, N. Pantarat, K. J. Gerik, R. Boadle, and J. T. Djordjevic.** 2008. Role and mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C in survival and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **69**:809-826.
56. **Chen, G., R. L. Fournier, S. Varanasi, and P. A. Mahama-Relue.** 1997. *Helicobacter pylori* survival in gastric mucosa by generation of a pH gradient. *Biophys. J.* **73**:1081-1088.
57. **Chen, J., K. S. de Felipe, M. Clarke, H. Lu, O. R. Anderson, G. Segal, and H. A. Shuman.** 2004. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science* **303**:1358-1361.
58. **Cianciotto, N. P., B. I. Eisenstein, C. H. Mody, and N. C. Engleberg.** 1990. A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *J. Infect. Dis.* **162**:121-126.
59. **Cirillo, J. D., S. L. Cirillo, L. Yan, L. E. Bermudez, S. Falkow, and L. S. Tompkins.** 1999. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **67**:4427-4434.
60. **Coers, J., J. C. Kagan, M. Matthews, H. Nagai, D. M. Zuckman, and C. R. Roy.** 2000. Identification of Icm protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol. Microbiol.* **38**:719-736.
61. **Coers, J., R. E. Vance, M. F. Fontana, and W. F. Dietrich.** 2007. Restriction of *Legionella pneumophila* growth in macrophages requires the concerted action of cytokine and Naip5/Ipaf signalling pathways. *Cell Microbiol.* **9**:2344-2357.
62. **Conover, G. M., I. Derre, J. P. Vogel, and R. R. Isberg.** 2003. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* **48**:305-321.

LITERATURVERZEICHNIS

63. Cox, G. M., H. C. McDade, S. C. Chen, S. C. Tucker, M. Gottfredsson, L. C. Wright, T. C. Sorrell, S. D. Leidich, A. Casadevall, M. A. Ghannoum, and J. R. Perfect. 2001. Extracellular phospholipase activity is a virulence factor for *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**:166-175.
64. Craig, A., J. Mai, S. Cai, and S. Jeyaseelan. 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect. Immun.* **77**:568-575.
65. Cuzick, A., F. R. Stirling, S. L. Lindsay, and T. J. Evans. 2006. The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production. *Infect. Immun.* **74**:4104-4113.
66. de Haas, C. J., K. E. Veldkamp, A. Peschel, F. Weerkamp, W. J. Van Wamel, E. C. Heezius, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp. 2004. Chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*, a bacterial antiinflammatory agent. *J. Exp. Med.* **199**:687-695.
67. de Rudder, K. E., J. E. Thomas-Oates, and O. Geiger. 1997. *Rhizobium meliloti* mutants deficient in phospholipid N-methyltransferase still contain phosphatidylcholine. *J. Bacteriol.* **179**:6921-6928.
68. Declerck, P., J. Behets, A. Margineanu, H. van, V, K. B. De, and F. Ollevier. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* **164**:593-603.
69. Declerck, P., J. Behets, H. van, V, and F. Ollevier. 2007. Replication of *Legionella pneumophila* in floating biofilms. *Curr. Microbiol.* **55**:435-440.
70. Derewenda, Z. S. and A. M. Sharp. 1993. News from the interface: the molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.* **18**:20-25.
71. DeSilva, N. S., I. Ofek, and E. C. Crouch. 2003. Interactions of surfactant protein D with fatty acids. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**:757-770.
72. Desjardins, M., J. E. Celis, M. G. van, H. Dieplinger, A. Jahraus, G. Griffiths, and L. A. Huber. 1994. Molecular characterization of phagosomes. *J. Biol. Chem.* **269**:32194-32200.
73. Devaux, P. F. and R. Morris. 2004. Transmembrane asymmetry and lateral domains in biological membranes. *Traffic.* **5**:241-246.
74. Diederén, B. M. 2008. *Legionella* spp. and Legionnaires' disease. *J. Infect.* **56**:1-12.
75. Doery, H. M., B. J. Magnusson, I. M. Cheyne, and J. Sulasekharam. 1963. A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin. *Nature* **198**:1091-1092.
76. Dorrell, N., M. C. Martino, R. A. Stabler, S. J. Ward, Z. W. Zhang, A. A. McColm, M. J. Farthing, and B. W. Wren. 1999. Characterization of *Helicobacter pylori* PldA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa. *Gastroenterology* **117**:1098-1104.
77. Dunn, B. E., H. Cohen, and M. J. Blaser. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:720-741.
78. Edelstein, P. H. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* **14**:298-303.
79. Edelstein, P. H. 2007. Urine antigen tests positive for Pontiac fever: implications for diagnosis and pathogenesis. *Clin. Infect. Dis.* **44**:229-231.
80. Erridge, C., A. Pridmore, A. Eley, J. Stewart, and I. R. Poxton. 2004. Lipopolysaccharides of *Bacteroides fragilis*, *Chlamydia trachomatis* and *Pseudomonas aeruginosa* signal via toll-like receptor 2. *J. Med. Microbiol.* **53**:735-740.
81. Exton, J. H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**:26-42.

LITERATURVERZEICHNIS

82. **Fang, G. D., V. L. Yu, and R. M. Vickers.** 1989. Disease due to the Legionellaceae (other than *Legionella pneumophila*). Historical, microbiological, clinical, and epidemiological review. *Medicine (Baltimore)* **68**:116-132.
83. **Fang, X., S. Gibson, M. Flowers, T. Furui, R. C. Bast, Jr., and G. B. Mills.** 1997. Lysophosphatidylcholine stimulates activator protein 1 and the c-Jun N-terminal kinase activity. *J. Biol. Chem.* **272**:13683-13689.
84. **Feeley, J. C., R. J. Gibson, G. W. Gorman, N. C. Langford, J. K. Rasheed, D. C. Mackel, and W. B. Baine.** 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **10**:437-441.
85. **Fields, B. S.** 1996. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol.* **4**:286-290.
86. **Fields, B. S., R. F. Benson, and R. E. Besser.** 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:506-526.
87. **Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank.** 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* **25**:547-557.
88. **Finnerty, W. R., R. A. Makula, and J. C. Feeley.** 1979. Cellular lipids of the Legionnaires' disease bacterium. *Ann. Intern. Med.* **90**:631-634.
89. **Flieger, A., S. Banerji, M. Broich, K. Rydzewski, and W. S. Shadrach.** 2003. Pathogenese der Legionelleninfektion. *Bundesgesundheitsblatt* **46**:694-699.
90. **Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, M. Deeg, P. Bartmann, and B. Neumeister.** 2000. Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J. Bacteriol.* **182**:1321-1327.
91. **Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, S. Stevanovic, N. P. Cianciotto, and B. Neumeister.** 2001. Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* **183**:2121-2124.
92. **Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, H. A. Mayer, U. Kehrer, J. Mussotter, P. Bartmann, and B. Neumeister.** 2000. Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:129-133.
93. **Flieger, A., B. Neumeister, and N. P. Cianciotto.** 2002. Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* **70**:6094-6106.
94. **Flieger, A., K. Rydzewski, S. Banerji, M. Broich, and K. Heuner.** 2004. Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infect. Immun.* **72**:2648-2658.
95. **Fliermans, C. B., W. B. Cherry, L. H. Orrison, S. J. Smith, D. L. Tison, and D. H. Pope.** 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**:9-16.
96. **Franco, I. S., H. A. Shuman, and X. Charpentier.** 2009. The perplexing functions and surprising origins of *Legionella pneumophila* type IV secretion effectors. *Cell Microbiol.* **11**:1435-1443.
97. **Frank, D. W.** 1997. The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **26**:621-629.
98. **Fraser, J. D. and T. Proft.** 2008. The bacterial superantigen and superantigen-like proteins. *Immunol. Rev.* **225**:226-243.
99. **Freeman, J. A., M. E. Ohl, and S. I. Miller.** 2003. The *Salmonella enterica* serovar typhimurium translocated effectors SseJ and SifB are targeted to the *Salmonella*-containing vacuole. *Infect. Immun.* **71**:418-427.

LITERATURVERZEICHNIS

100. **Fujii, Y. and J. Sakurai.** 1989. Contraction of the rat isolated aorta caused by *Clostridium perfringens* alpha toxin (phospholipase C): evidence for the involvement of arachidonic acid metabolism. *Br. J. Pharmacol.* **97**:119-124.
101. **Fukuda, E. Y., S. P. Lad, D. P. Mikolon, M. Iacobelli-Martinez, and E. Li.** 2005. Activation of lipid metabolism contributes to interleukin-8 production during *Chlamydia trachomatis* infection of cervical epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**:4017-4024.
102. **Fuse, E. T., K. Tateda, Y. Kikuchi, T. Matsumoto, F. Gondaira, A. Azuma, S. Kudoh, T. J. Standiford, and K. Yamaguchi.** 2007. Role of Toll-like receptor 2 in recognition of *Legionella pneumophila* in a murine pneumonia model. *J. Med. Microbiol.* **56**:305-312.
103. **Galka, F., S. N. Wai, H. Kusch, S. Engelmann, M. Hecker, B. Schmeck, S. Hippenstiel, B. E. Uhlin, and M. Steinert.** 2008. Proteomic characterization of the whole secretome of *Legionella pneumophila* and functional analysis of outer membrane vesicles. *Infect. Immun.* **76**:1825-1836.
104. **Ganendren, R., E. Carter, T. Sorrell, F. Widmer, and L. Wright.** 2006. Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line. *Microbes. Infect.* **8**:1006-1015.
105. **Gao, L. Y. and K. Y. Abu.** 1999. Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect. Immun.* **67**:4886-4894.
106. **Gao, L. Y., M. Susa, B. Ticac, and K. Y. Abu.** 1999. Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb. Pathog.* **27**:273-287.
107. **Gharahdaghi, F., C. R. Weinberg, D. A. Meagher, B. S. Imai, and S. M. Mische.** 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* **20**:601-605.
108. **Ghosh, J., P. Larsson, B. Singh, B. M. Pettersson, N. M. Islam, S. N. Sarkar, S. Dasgupta, and L. A. Kirsebom.** 2009. Sporulation in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:10781-10786.
109. **Girard, R., T. Pedron, S. Uematsu, V. Balloy, M. Chignard, S. Akira, and R. Chaby.** 2003. Lipopolysaccharides from *Legionella* and *Rhizobium* stimulate mouse bone marrow granulocytes via Toll-like receptor 2. *J. Cell Sci.* **116**:293-302.
110. **Girod, A., C. E. Wobus, Z. Zadori, M. Ried, K. Leike, P. Tijssen, J. A. Kleinschmidt, and M. Hallek.** 2002. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **83**:973-978.
111. **Glick, T. H., M. B. Gregg, B. Berman, G. Mallison, W. W. Rhodes, Jr., and I. Kassanoff.** 1978. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am. J. Epidemiol.* **107**:149-160.
112. **Gotz, D., A. Banta, T. J. Beveridge, A. I. Rushdi, B. R. Simoneit, and A. L. Reysenbach.** 2002. *Persephonella marina* gen. nov., sp. nov. and *Persephonella guaymasensis* sp. nov., two novel, thermophilic, hydrogen-oxidizing microaerophiles from deep-sea hydrothermal vents. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:1349-1359.
113. **Green, D. H., J. P. Bowman, E. A. Smith, T. Gutierrez, and C. J. Bolch.** 2006. *Marinobacter algicola* sp. nov., isolated from laboratory cultures of paralytic shellfish toxin-producing dinoflagellates. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**:523-527.
114. **Griffith, M. E., D. S. Lindquist, R. F. Benson, W. L. Thacker, D. J. Brenner, and H. W. Wilkinson.** 1988. First isolation of *Legionella gormanii* from human disease. *J. Clin. Microbiol.* **26**:380-381.

LITERATURVERZEICHNIS

115. **Gustafson, C. and C. Tagesson.** 1990. Phospholipase C from *Clostridium perfringens* stimulates phospholipase A2-mediated arachidonic acid release in cultured intestinal epithelial cells (INT 407). *Scand. J. Gastroenterol.* **25**:363-371.
116. **Hagele, S., R. Kohler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, and M. Steinert.** 2000. *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*. *Cell Microbiol.* **2**:165-171.
117. **Hammer, B. K. and M. S. Swanson.** 1999. Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* **33**:721-731.
118. **Hancock, R. E., L. M. Mutharia, L. Chan, R. P. Darveau, D. P. Speert, and G. B. Pier.** 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* **42**:170-177.
119. **Hancock, R. E. and D. P. Speert.** 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat.* **3**:247-255.
120. **Harju, S., H. Fedosyuk, and K. R. Peterson.** 2004. Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab. *BMC. Biotechnol.* **4**:8.
121. **Hauser, A. R. and J. N. Engel.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect. Immun.* **67**:5530-5537.
122. **Hawn, T. R., K. D. Smith, A. Aderem, and S. J. Skerrett.** 2006. Myeloid differentiation primary response gene (88)- and toll-like receptor 2-deficient mice are susceptible to infection with aerosolized *Legionella pneumophila*. *J. Infect. Dis.* **193**:1693-1702.
123. **Hawn, T. R., A. Verbon, K. D. Lettinga, L. P. Zhao, S. S. Li, R. J. Laws, S. J. Skerrett, B. Beutler, L. Schroeder, A. Nachman, A. Ozinsky, K. D. Smith, and A. Aderem.** 2003. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J. Exp. Med.* **198**:1563-1572.
124. **Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**:1099-1103.
125. **Heath, C. H., D. I. Grove, and D. F. Looke.** 1996. Delay in appropriate therapy of *Legionella pneumonia* associated with increased mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**:286-290.
126. **Hebert, G. A., C. W. Moss, L. K. McDougal, F. M. Bozeman, R. M. McKinney, and D. J. Brenner.** 1980. The *rickettsia*-like organisms TATLOCK (1943) and HEBA (1959): bacteria phenotypically similar to but genetically distinct from *Legionella pneumophila* and the WIGA bacterium. *Ann. Intern. Med.* **92**:45-52.
127. **Heidtman, M., E. J. Chen, M. Y. Moy, and R. R. Isberg.** 2009. Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol.* **11**:230-248.
128. **Helbig, J. H., S. Bernander, P. M. Castellani, J. Etienne, V. Gaia, S. Lauwers, D. Lindsay, P. C. Luck, T. Marques, S. Mentula, M. F. Peeters, C. Pelaz, M. Struelens, S. A. Uldum, G. Wewalka, and T. G. Harrison.** 2002. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **21**:710-716.
129. **Hilbi, H., G. Segal, and H. A. Shuman.** 2001. Icm/dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **42**:603-617.
130. **Hildebran, J. N., J. Goerke, and J. A. Clements.** 1979. Pulmonary surface film stability and composition. *J. Appl. Physiol* **47**:604-611.

LITERATURVERZEICHNIS

131. **Hirakata, Y., B. B. Finlay, D. A. Simpson, S. Kohno, S. Kamihira, and D. P. Speert.** 2000. Penetration of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* through MDCK epithelial cell monolayers. *J. Infect. Dis.* **181**:765-769.
132. **Hoffman, P. S., L. Pine, and S. Bell.** 1983. Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:784-791.
133. **Hoffmann, C., A. Leis, M. Niederweis, J. M. Plitzko, and H. Engelhardt.** 2008. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:3963-3967.
134. **Hoogerwerf, J. J., A. F. de Vos, P. Bresser, J. S. van der Zee, J. M. Pater, B. A. de, M. Tanck, D. L. Lundell, C. Her-Jenh, C. Draing, A. S. von, and T. van der Poll.** 2008. Lung inflammation induced by lipoteichoic acid or lipopolysaccharide in humans. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **178**:34-41.
135. **Horwitz, M. A.** 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**:1319-1331.
136. **Horwitz, M. A.** 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* **158**:2108-2126.
137. **Horwitz, M. A.** 1984. Phagocytosis of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) occurs by a novel mechanism: engulfment within a pseudopod coil. *Cell* **36**:27-33.
138. **Horwitz, M. A. and F. R. Maxfield.** 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* **99**:1936-1943.
139. **Horwitz, M. A. and S. C. Silverstein.** 1981. Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement. *J. Exp. Med.* **153**:386-397.
140. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.
141. **Huseby, M., K. Shi, C. K. Brown, J. Digre, F. Mengistu, K. S. Seo, G. A. Bohach, P. M. Schlievert, D. H. Ohlendorf, and C. A. Earhart.** 2007. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**:8719-8726.
142. **Jaeger, K. E., S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato, and B. W. Dijkstra.** 1993. Topological characterization and modeling of the 3D structure of lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett.* **332**:143-149.
143. **Jepras, R. I., R. B. Fitzgeorge, and A. Baskerville.** 1985. A comparison of virulence of two strains of *Legionella pneumophila* based on experimental aerosol infection of guinea-pigs. *J. Hyg. (Lond)* **95**:29-38.
144. **Johansen, K. A., R. E. Gill, and M. L. Vasil.** 1996. Biochemical and molecular analysis of phospholipase C and phospholipase D activity in mycobacteria. *Infect. Immun.* **64**:3259-3266.
145. **Katz, S. M. and J. M. Hammel.** 1987. The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. *Ann. Clin. Lab Sci.* **17**:150-156.
146. **Katz, S. M. and S. Hashemi.** 1982. Electron microscopic examination of the inflammatory response to *Legionella pneumophila* in guinea pigs. *Lab Invest* **46**:24-32.
147. **Kawai, T. and S. Akira.** 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**:317-337.

LITERATURVERZEICHNIS

148. **Kikuchi, T., T. Kobayashi, K. Gomi, T. Suzuki, Y. Tokue, A. Watanabe, and T. Nukiwa.** 2004. Dendritic cells pulsed with live and dead *Legionella pneumophila* elicit distinct immune responses. *J. Immunol.* **172**:1727-1734.
149. **Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish.** 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal Infect.* **36**:78-91.
150. **Kirby, J. E., J. P. Vogel, H. L. Andrews, and R. R. Isberg.** 1998. Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*. *Mol. Microbiol.* **27**:323-336.
151. **Koduri, R. S., J. O. Gronroos, V. J. Laine, C. C. Le, G. Lambeau, T. J. Nevalainen, and M. H. Gelb.** 2002. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A(2). *J. Biol. Chem.* **277**:5849-5857.
152. **Konig, B., M. L. Vasil, and W. Konig.** 1997. Role of haemolytic and non-haemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* in interleukin-8 release from human monocytes. *J. Med. Microbiol.* **46**:471-478.
153. **Kragshjerg, P., I. Jones, T. Vikerfors, and H. Holmberg.** 1995. Diagnostic value of blood cytokine concentrations in acute pneumonia. *Thorax* **50**:1253-1257.
154. **Krug, E. L. and C. Kent.** 1984. Phospholipase C from *Clostridium perfringens*: preparation and characterization of homogeneous enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**:400-410.
155. **Kubori, T., A. Hyakutake, and H. Nagai.** 2008. *Legionella* translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. *Mol. Microbiol.* **67**:1307-1319.
156. **Kuehn, M. J. and N. C. Kesty.** 2005. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* **19**:2645-2655.
157. **Kyte, J. and R. F. Doolittle.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**:105-132.
158. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
159. **Laguna, R. K., E. A. Creasey, Z. Li, N. Valtz, and R. R. Isberg.** 2006. A *Legionella pneumophila*-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:18745-18750.
160. **Lambert, E., E. Dasse, B. Haye, and E. Petitfrere.** 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* **49**:187-198.
161. **Lawley, T. D., K. Chan, L. J. Thompson, C. C. Kim, G. R. Govoni, and D. M. Monack.** 2006. Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS. Pathog.* **2**:e11.
162. **Lawson, P. R. and K. B. Reid.** 2000. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol. Rev.* **173**:66-78.
163. **Lazarus, B. D., M. D. Roos, and J. A. Hanover.** 2005. Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase. *J. Biol. Chem.* **280**:35537-35544.
164. **Lee, L. C., Y. L. Lee, R. J. Leu, and J. F. Shaw.** 2006. Functional role of catalytic triad and oxyanion hole-forming residues on enzyme activity of *Escherichia coli* thioesterase I/protease I/phospholipase L1. *Biochem. J.* **397**:69-76.
165. **Leonardo, M. R., D. P. Moser, E. Barbieri, C. A. Brantner, B. J. MacGregor, B. J. Paster, E. Stackebrandt, and K. H. Nealson.** 1999. *Shewanella pealeana* sp. nov., a member of the microbial community associated with the accessory nidamental gland of the squid *Loligo pealei*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49 Pt 4**:1341-1351.

LITERATURVERZEICHNIS

166. **Levin, A. S.** 2009. Nosocomial legionellosis: prevention and management. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **7**:57-68.
167. **Liles, M. R., V. K. Viswanathan, and N. P. Cianciotto.** 1998. Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion. *Infect. Immun.* **66**:1776-1782.
168. **Lin-Cereghino, J., W. W. Wong, S. Xiong, W. Giang, L. T. Luong, J. Vu, S. D. Johnson, and G. P. Lin-Cereghino.** 2005. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* **38**:44, 46, 48.
169. **Lowy, F. D.** 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *N. Engl. J. Med.* **339**:520-532.
170. **Macfarlane, J. T., A. C. Miller, W. H. Roderick Smith, A. H. Morris, and D. H. Rose.** 1984. Comparative radiographic features of community acquired Legionnaires' disease, pneumococcal pneumonia, mycoplasma pneumonia, and psittacosis. *Thorax* **39**:28-33.
171. **Machner, M. P. and R. R. Isberg.** 2006. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. *Dev. Cell* **11**:47-56.
172. **Mahoney, F. J., C. W. Hoge, T. A. Farley, J. M. Barbaree, R. F. Breiman, R. F. Benson, and L. M. McFarland.** 1992. Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine. *J. Infect. Dis.* **165**:736-739.
173. **Marshall, M. J., G. A. Bohach, and D. F. Boehm.** 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* beta-toxin induced leukotoxicity. *J. Nat. Toxins.* **9**:125-138.
174. **Marston, B. J., H. B. Lipman, and R. F. Breiman.** 1994. Surveillance for Legionnaires' disease. Risk factors for morbidity and mortality. *Arch. Intern. Med.* **154**:2417-2422.
175. **Mashburn, L. M. and M. Whiteley.** 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**:422-425.
176. **Mauchline, W. S., B. W. James, R. B. Fitzgeorge, P. J. Dennis, and C. W. Keevil.** 1994. Growth temperature reversibly modulates the virulence of *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **62**:2995-2997.
177. **McDade, J. E., D. J. Brenner, and F. M. Bozeman.** 1979. Legionnaires' disease bacterium isolated in 1947. *Ann. Intern. Med.* **90**:659-661.
178. **McDade, J. E., C. C. Shepard, D. W. Fraser, T. R. Tsai, M. A. Redus, and W. R. Dowdle.** 1977. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N. Engl. J. Med.* **297**:1197-1203.
179. **McGowan, C. C., A. Necheva, S. A. Thompson, T. L. Cover, and M. J. Blaser.** 1998. Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **30**:19-31.
180. **McKinney, J. D., B. K. Honer zu, E. J. Munoz-Elias, A. Miczak, B. Chen, W. T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs, Jr., and D. G. Russell.** 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**:735-738.
181. **McMorran, B., L. Town, E. Costelloe, J. Palmer, J. Engel, D. Hume, and B. Wainwright.** 2003. Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun.* **71**:6035-6044.
182. **Meyers, D. J. and R. S. Berk.** 1990. Characterization of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa* as a potent inflammatory agent. *Infect. Immun.* **58**:659-666.
183. **Miller, M. D. and M. S. Krangel.** 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev. Immunol.* **12**:17-46.

LITERATURVERZEICHNIS

184. **Molmeret, M., O. A. Alli, S. Zink, A. Flieger, N. P. Cianciotto, and Y. A. Kwaik.** 2002. IcmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* **70**:69-78.
185. **Molofsky, A. B., B. G. Byrne, N. N. Whitfield, C. A. Madigan, E. T. Fuse, K. Tateda, and M. S. Swanson.** 2006. Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts *Legionella pneumophila* infection. *J. Exp. Med.* **203**:1093-1104.
186. **Mouchtouri, V. A., G. Goutziana, J. Kremastinou, and C. Hadjichristodoulou.** 2009. *Legionella* species colonization in cooling towers: Risk factors and assessment of control measures. *Am. J. Infect. Control.* in press.
187. **Muder, R. R. and V. L. Yu.** 2002. Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clin. Infect. Dis.* **35**:990-998.
188. **Muder, R. R., V. L. Yu, R. M. Vickers, J. Rihs, and J. Shonnard.** 1983. Simultaneous infection with *Legionella pneumophila* and Pittsburgh pneumonia agent. Clinical features and epidemiologic implications. *Am. J. Med.* **74**:609-614.
189. **Murata, T., A. Delprato, A. Ingmundson, D. K. Toomre, D. G. Lambright, and C. R. Roy.** 2006. The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor. *Nat. Cell Biol.* **8**:971-977.
190. **Murga, R., T. S. Forster, E. Brown, J. M. Pruckler, B. S. Fields, and R. M. Donlan.** 2001. Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. *Microbiology* **147**:3121-3126.
191. **Nagai, H., J. C. Kagan, X. Zhu, R. A. Kahn, and C. R. Roy.** 2002. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**:679-682.
192. **Nardini, M. and B. W. Dijkstra.** 1999. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:732-737.
193. **Nawabi, P., D. M. Catron, and K. Haldar.** 2008. Esterification of cholesterol by a type III secretion effector during intracellular *Salmonella* infection. *Mol. Microbiol.* **68**:173-185.
194. **Naylor, C. E., J. T. Eaton, A. Howells, N. Justin, D. S. Moss, R. W. Titball, and A. K. Basak.** 1998. Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat. Struct. Biol.* **5**:738-746.
195. **Neild, A., T. Murata, and C. R. Roy.** 2005. Processing and major histocompatibility complex class II presentation of *Legionella pneumophila* antigens by infected macrophages. *Infect. Immun.* **73**:2336-2343.
196. **Ninio, S. and C. R. Roy.** 2007. Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends Microbiol.* **15**:372-380.
197. **Ohlson, M. B., K. Fluhr, C. L. Birmingham, J. H. Brumell, and S. I. Miller.** 2005. SseJ deacylase activity by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes virulence in mice. *Infect. Immun.* **73**:6249-6259.
198. **Ollis, D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, and .** 1992. The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**:197-211.
199. **Opitz, B., M. Vinzing, L. van, V. B. Schmeck, G. Heine, S. Gunther, R. Preissner, H. Slevogt, P. D. N'guessan, J. Eitel, T. Goldmann, A. Flieger, N. Suttorp, and S. Hippenstiel.** 2006. *Legionella pneumophila* induces IFNbeta in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J. Biol. Chem.* **281**:36173-36179.
200. **Ott, M., P. Messner, J. Heesemann, R. Marre, and J. Hacker.** 1991. Temperature-dependent expression of flagella in *Legionella*. *J. Gen. Microbiol.* **137**:1955-1961.

LITERATURVERZEICHNIS

201. **Palusinska-Szys, M., R. Kalitynski, R. Russa, A. L. Dawidowicz, and W. J. Drozanski.** 2008. Cellular envelope phospholipids from *Legionella lytica*. *FEMS Microbiol. Lett.* **283**:239-246.
202. **Pandey, A., S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, and V. T. Soccol.** 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **29 (Pt 2)**:119-131.
203. **Park, D. R. and S. J. Skerrett.** 1996. IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of IFN-gamma: differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* **157**:2528-2538.
204. **Pasculle, A. W., J. C. Feeley, R. J. Gibson, L. G. Cordes, R. L. Myerowitz, C. M. Patton, G. W. Gorman, C. L. Carmack, J. W. Ezzell, and J. N. Dowling.** 1980. Pittsburgh pneumonia agent: direct isolation from human lung tissue. *J. Infect. Dis.* **141**:727-732.
205. **Phillips, R. M., D. A. Six, E. A. Dennis, and P. Ghosh.** 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J. Biol. Chem.* **278**:41326-41332.
206. **Plekhanov, A. Y.** 1999. Rapid staining of lipids on thin-layer chromatograms with amido black 10B and other water-soluble stains. *Anal. Biochem.* **271**:186-187.
207. **Plouffe, J. F., T. M. File, Jr., R. F. Breiman, B. A. Hackman, S. J. Salstrom, B. J. Marston, and B. S. Fields.** 1995. Reevaluation of the definition of Legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin. Infect. Dis.* **20**:1286-1291.
208. **Plumlee, C. R., C. Lee, A. A. Beg, T. Decker, H. A. Shuman, and C. Schindler.** 2009. Interferons direct an effective innate response to *Legionella pneumophila* infection. *J. Biol. Chem.* **284**:30058-66.
209. **Prabhakaran, K., E. B. Harris, and B. Randhawa.** 1996. Properties of lysophospholipase in *Mycobacterium leprae*. *J. Basic Microbiol.* **36**:341-349.
210. **Prince, A.** 2006. Flagellar activation of epithelial signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **34**:548-551.
211. **Ragaz, C., H. Pietsch, S. Urwyler, A. Tiaden, S. S. Weber, and H. Hilbi.** 2008. The *Legionella pneumophila* phosphatidylinositol-4 phosphate-binding type IV substrate SidC recruits endoplasmic reticulum vesicles to a replication-permissive vacuole. *Cell Microbiol.* **10**:2416-2433.
212. **Rastew E.** 2009. Untersuchung der Rolle der GDSL-Hydrolasen für die Pathogenität von *Legionella pneumophila*. *Doctoral Thesis*. Humboldt-Universität zu Berlin.
213. **Raynaud, C., C. Guilhot, J. Rauzier, Y. Bordat, V. Pelicic, R. Manganelli, I. Smith, B. Gicquel, and M. Jackson.** 2002. Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **45**:203-217.
214. **Rechnitzer, C. and J. Blom.** 1989. Engulfment of the Philadelphia strain of *Legionella pneumophila* within pseudopod coils in human phagocytes. Comparison with other *Legionella* strains and species. *APMIS* **97**:105-114.
215. **Reman.** 1971. *Doctoral Thesis*. University of Utrecht.
216. **Ren, T., D. S. Zamboni, C. R. Roy, W. F. Dietrich, and R. E. Vance.** 2006. Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity. *PLoS. Pathog.* **2**:e18.
217. **Ricard, J., H. Pelloux, A. L. Favier, U. Gross, E. Brambilla, and P. mbroise-Thomas.** 1999. *Toxoplasma gondii*: role of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C during cell invasion and intracellular development. *Exp. Parasitol.* **91**:231-237.
218. **Robinson, C. G. and C. R. Roy.** 2006. Attachment and fusion of endoplasmic reticulum with vacuoles containing *Legionella pneumophila*. *Cell Microbiol.* **8**:793-805.

LITERATURVERZEICHNIS

219. **Rodgers, H. C., L. Pang, E. Holland, L. Corbett, S. Range, and A. J. Knox.** 2002. Bradykinin increases IL-8 generation in airway epithelial cells via COX-2-derived prostanoids. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **283**:L612-L618.
220. **Rogers, J., A. Hakki, I. Perkins, C. Newton, R. Widen, N. Burdash, T. Klein, and H. Friedman.** 2007. *Legionella pneumophila* infection up-regulates dendritic cell Toll-like receptor 2 (TLR2)/TLR4 expression and key maturation markers. *Infect. Immun.* **75**:3205-3208.
221. **Rogers, J. and C. W. Keevil.** 1992. Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2326-2330.
222. **Rose, D., J. Rendell, D. Lee, K. Nag, and V. Booth.** 2008. Molecular dynamics simulations of lung surfactant lipid monolayers. *Biophys. Chem.* **138**:67-77.
223. **Rossier, O., J. Dao, and N. P. Cianciotto.** 2009. A type II secreted RNase of *Legionella pneumophila* facilitates optimal intracellular infection of *Hartmannella vermiformis*. *Microbiology* **155**:882-890.
224. **Rot, A., M. Krieger, T. Brunner, S. C. Bischoff, T. J. Schall, and C. A. Dahinden.** 1992. RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* **176**:1489-1495.
225. **Rowbotham, T. J.** 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**:1179-1183.
226. **Rowbotham, T. J.** 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Isr. J. Med. Sci.* **22**:678-689.
227. **Roy, C. R., K. H. Berger, and R. R. Isberg.** 1998. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* **28**:663-674.
228. **Ruehleemann, S. A. and G. R. Crawford.** 1996. Panic in the potting shed. The association between *Legionella longbeachae* serogroup 1 and potting soils in Australia. *Med. J. Aust.* **164**:36-38.
229. **Ruiz-Albert, J., X. J. Yu, C. R. Beuzon, A. N. Blakey, E. E. Galyov, and D. W. Holden.** 2002. Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella* typhimurium vacuolar membrane. *Mol. Microbiol.* **44**:645-661.
230. **Russell, R. J., P. C. Wilkinson, R. J. McInroy, S. McKay, A. C. McCartney, and J. P. Arbuthnott.** 1976. Effects of staphylococcal products on locomotion and chemotaxis of human blood neutrophils and monocytes. *J. Med. Microbiol.* **9**:433-439.
231. **Rydel, T. J., J. M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W. C. Stallings, S. M. Brown, J. C. Pershing, J. P. Purcell, and M. F. Alibhai.** 2003. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. *Biochemistry* **42**:6696-6708.
232. **Saatian, B., Y. Zhao, D. He, S. N. Georas, T. Watkins, E. W. Spannhake, and V. Natarajan.** 2006. Transcriptional regulation of lysophosphatidic acid-induced interleukin-8 expression and secretion by p38 MAPK and JNK in human bronchial epithelial cells. *Biochem. J.* **393**:657-668.
233. **Saidel-Odes, L., A. Borer, K. Riesenber, and F. Schlaeffer.** 2007. *Shewanella* spp. infection following treatment for upper gastrointestinal bleeding. *Scand. J. Infect. Dis.* **39**:360-361.
234. **Saliba, A. M., D. O. Nascimento, M. C. Silva, M. C. Assis, C. R. Gayer, B. Raymond, M. G. Coelho, E. A. Marques, L. Touqui, R. M. Albano, U. G. Lopes, D. D. Paiva, P. T. Bozza, and M. C. Plotkowski.** 2005. Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Cell Microbiol.* **7**:1811-1822.
235. **Salyers, A. and D. Whitt.** 2002. *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*, 2nd edn. ASM Press .

LITERATURVERZEICHNIS

236. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
237. **Sato, H., J. B. Feix, and D. W. Frank.** 2006. Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the *pseudomonas* type III toxin, ExoU. *Biochemistry* **45**:10368-10375.
238. **Sato, H. and D. W. Frank.** 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase. *Mol. Microbiol.* **53**:1279-1290.
239. **Sato, H., D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* **22**:2959-2969.
240. **Schiess, K., M. Kaszkin, P. Jordan, L. Seidler, and V. Kinzel.** 1992. Mobilization of diacylglycerol in intact HeLa cells by exogenous phospholipase C from *Cl. perfringens* is accompanied by release of fatty acids including arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1137**:82-94.
241. **Schmeck, B., P. D. N'guessan, M. Ollomang, J. Lorenz, J. Zahlten, B. Opitz, A. Flieger, N. Suttorp, and S. Hippenstiel.** 2007. *Legionella pneumophila*-induced NF-kappaB- and MAPK-dependent cytokine release by lung epithelial cells. *Eur. Respir. J.* **29**:25-33.
242. **Schmiel, D. H. and V. L. Miller.** 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes. Infect.* **1**:1103-1112.
243. **Schroder, N. W., S. Morath, C. Alexander, L. Hamann, T. Hartung, U. Zahring, U. B. Gobel, J. R. Weber, and R. R. Schumann.** 2003. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* **278**:15587-15594.
244. **Schulert, G. S., H. Feltman, S. D. Rabin, C. G. Martin, S. E. Battle, J. Rello, and A. R. Hauser.** 2003. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J. Infect. Dis.* **188**:1695-1706.
245. **Schulz, T.** 2001. Molekulare Grundlagen der Stereoselektivität Lipase-katalysierter Umsetzungen. *Doctoral Thesis.* Universität Stuttgart.
246. **Schunder, E.** 2009. Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation der Phospholipase A/Lysophospholipase A (PlaB) von *Legionella pneumophila*. *Doctoral Thesis.* Humboldt-Universität zu Berlin.
247. **Schunder, E., P. Adam, F. Higa, K. A. Remer, U. Lorenz, J. Bender, T. Schulz, A. Flieger, M. Steinert, and K. Heuner.** 2010. Phospholipase PlaB is a new virulence factor of *Legionella pneumophila*. *Int.J.Med.Microbiol.* doi: 10.1016/j.ijmm.2010.01.002.
248. **Segal, G., M. Purcell, and H. A. Shuman.** 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**:1669-1674.
249. **Shadrach, W. S., K. Rydzewski, U. Laube, G. Holland, M. Ozel, A. F. Kiderlen, and A. Flieger.** 2005. *Balamuthia mandrillaris*, free-living ameba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for *Legionella pneumophila* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:2244-2249.
250. **Shapiro, S. D., D. K. Kobayashi, and H. G. Welgus.** 1992. Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1. *J. Biol. Chem.* **267**:13890-13894.
251. **Shim, H. K., J. Y. Kim, M. J. Kim, H. S. Sim, D. W. Park, J. W. Sohn, and M. J. Kim.** 2009. *Legionella* peptidoglycan-associated lipoprotein activates toll-like receptor 2 and induces cytokine

LITERATURVERZEICHNIS

- production and expression of costimulatory molecules in peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Med.* **41**:687-94.
252. **Shin, S., C. L. Case, K. A. Archer, C. V. Nogueira, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell, C. R. Roy, and D. S. Zamboni.** 2008. Type IV secretion-dependent activation of host MAP kinases induces an increased proinflammatory cytokine response to *Legionella pneumophila*. *PLoS. Pathog.* **4**:e1000220.
 253. **Shohdy, N., J. A. Efe, S. D. Emr, and H. A. Shuman.** 2005. Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:4866-4871.
 254. **Singh, B. R. and V. D. Sharma.** 1998. Purification and characterization of phospholipase C of *Salmonella gallinarum*. *Indian J. Exp. Biol.* **36**:1245-1252.
 255. **Smith-Somerville, H. E., V. B. Huryn, C. Walker, and A. L. Winters.** 1991. Survival of *Legionella pneumophila* in the cold-water ciliate *Tetrahymena vorax*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2742-2749.
 256. **Snijder, H. J. and B. W. Dijkstra.** 2000. Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase. *Biochim. Biophys. Acta* **1488**:91-101.
 257. **Sohlenkamp, C., I. M. Lopez-Lara, and O. Geiger.** 2003. Biosynthesis of phosphatidylcholine in bacteria. *Prog. Lipid Res.* **42**:115-162.
 258. **Stanley, A. M., A. M. Treubrodt, P. Chuawong, T. L. Hendrickson, and K. G. Fleming.** 2007. Lipid chain selectivity by outer membrane phospholipase A. *J. Mol. Biol.* **366**:461-468.
 259. **Stein, M. A., K. Y. Leung, M. Zwick, P. F. Garcia-del, and B. B. Finlay.** 1996. Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**:151-164.
 260. **Steinert, M., G. Ockert, C. Luck, and J. Hacker.** 1998. Regrowth of *Legionella pneumophila* in a heat-disinfected plumbing system. *Zentralbl. Bakterirol.* **288**:331-342.
 261. **Stevens, D. L., B. E. Troyer, D. T. Merrick, J. E. Mitten, and R. D. Olson.** 1988. Lethal effects and cardiovascular effects of purified alpha- and theta-toxins from *Clostridium perfringens*. *J. Infect. Dis.* **157**:272-279.
 262. **Stone, B. J. and K. Y. Abu.** 1998. Expression of multiple pili by *Legionella pneumophila*: identification and characterization of a type IV pilin gene and its role in adherence to mammalian and protozoan cells. *Infect. Immun.* **66**:1768-1775.
 263. **Stout, J. E. and V. L. Yu.** 1997. Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* **337**:682-687.
 264. **Sturgill-Koszycki, S. and M. S. Swanson.** 2000. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* **192**:1261-1272.
 265. **Sugahara, T., T. Takahashi, S. Yamaya, and A. Ohsaka.** 1976. In vitro aggregation of platelets induced by alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **29**:255-263.
 266. **Susa, M., B. Ticac, T. Rukavina, M. Doric, and R. Marre.** 1998. *Legionella pneumophila* infection in intratracheally inoculated T cell-depleted or -nondepleted A/J mice. *J. Immunol.* **160**:316-321.
 267. **Swanson, M. S. and B. K. Hammer.** 2000. *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:567-613.
 268. **Tajima, A., T. Iwase, H. Shinji, K. Seki, and Y. Mizunoe.** 2009. Inhibition of endothelial interleukin-8 production and neutrophil transmigration by *Staphylococcus aureus* beta-hemolysin. *Infect. Immun.* **77**:327-334.

LITERATURVERZEICHNIS

269. **Takabe, W., Y. Kanai, A. Chairoungdua, N. Shibata, S. Toi, M. Kobayashi, T. Kodama, and N. Noguchi.** 2004. Lysophosphatidylcholine enhances cytokine production of endothelial cells via induction of L-type amino acid transporter 1 and cell surface antigen 4F2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**:1640-1645.
270. **Tamura, M., T. Ajayi, L. R. Allmond, K. Moriyama, J. P. Wiener-Kronish, and T. Sawa.** 2004. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316**:323-331.
271. **Tannaes, T., I. K. Bukholm, and G. Bukholm.** 2005. High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **44**:17-23.
272. **Tannaes, T., N. Dekker, G. Bukholm, J. J. Bijlsma, and B. J. Appelmelk.** 2001. Phase variation in the *Helicobacter pylori* phospholipase A gene and its role in acid adaptation. *Infect. Immun.* **69**:7334-7340.
273. **Tannaes, T., H. J. Grav, and G. Bukholm.** 2000. Lipid profiles of *Helicobacter pylori* colony variants. *APMIS* **108**:349-356.
274. **Teo, J. W., L. H. Zhang, and C. L. Poh.** 2003. Cloning and characterization of a novel lipase from *Vibrio harveyi* strain AP6. *Gene* **312**:181-188.
275. **Terada, L. S., K. A. Johansen, S. Nowbar, A. I. Vasil, and M. L. Vasil.** 1999. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect. Immun.* **67**:2371-2376.
276. **Teruya, H., F. Higa, M. Akamine, C. Ishikawa, T. Okudaira, K. Tomimori, N. Mukaida, M. Tateyama, K. Heuner, J. Fujita, and N. Mori.** 2007. Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC. Microbiol.* **7**:102.
277. **Tiesinga, J. J., P. G. van, M. Nardini, S. Ransac, and B. W. Dijkstra.** 2007. Structural basis of phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase. *J. Mol. Biol.* **371**:447-456.
278. **Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson, and C. R. Roy.** 2001. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane. *J. Cell Sci.* **114**:4637-4650.
279. **Titball, R. W.** 2005. Gas gangrene: an open and closed case. *Microbiology* **151**:2821-2828.
280. **Titball, R. W., S. E. Hunter, K. L. Martin, B. C. Morris, A. D. Shuttleworth, T. Rubidge, D. W. Anderson, and D. C. Kelly.** 1989. Molecular cloning and nucleotide sequence of the alpha-toxin (phospholipase C) of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immun.* **57**:367-376.
281. **Titball, R. W., C. E. Naylor, and A. K. Basak.** 1999. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Anaerobe* **5**:51-64.
282. **Upton, C. and J. T. Buckley.** 1995. A new family of lipolytic enzymes? *Trends Biochem. Sci.* **20**:178-179.
283. **Urbina, P., M. Flores-Diaz, A. ape-Giron, A. Alonso, and F. M. Goni.** 2009. Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Chem. Phys. Lipids* **159**:51-57.
284. **Vallis, A. J., V. Finck-Barbancon, T. L. Yahr, and D. W. Frank.** 1999. Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect. Immun.* **67**:2040-2044.
285. **van Kampen, J. W. Simons, N. Dekker, M. R. Egmond, and H. M. Verheij.** 1998. The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation. *Chem. Phys. Lipids* **93**:39-45.

LITERATURVERZEICHNIS

286. **Vance, R. and T. R. Hawn.** 2008. The Genetics and Immunology of Host Resistance to *Legionella* Infection, p. 75-100. K. Heuner and M. Swanson (ed.), *Legionella - Molecular Microbiology*. Caister Academic Press, Norfolk.
287. **VanRheenen, S. M., Z. Q. Luo, T. O'Connor, and R. R. Isberg.** 2006. Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect. Immun.* **74**:3597-3606.
288. **Vardarova, K., S. Scharf, F. Lang, B. Schmeck, B. Opitz, J. Eitel, A. C. Hocke, H. Slevogt, A. Flieger, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and P. D. N'guessan.** 2009. PKC{alpha} and {epsilon} differentially regulate *Legionella pneumophila* induced GM-CSF. *Eur. Respir. J.* **34**:1171-9.
289. **Velonakis, E. N., I. M. Kiouisi, C. Koutis, E. Papadogiannakis, F. Babatsikou, and A. Vatopoulos.** 2009. First isolation of *Legionella* species, including *L. pneumophila* serogroup 1, in Greek potting soils: possible importance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* Epub ahead of print.
290. **Venkataraman, C., B. J. Haack, S. Bondada, and K. Y. Abu.** 1997. Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmannella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. *J. Exp. Med.* **186**:537-547.
291. **Venza, I., M. Cucinotta, M. Visalli, G. G. De, S. Oliva, and D. Teti.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa* induces interleukin-8 (IL-8) gene expression in human conjunctiva through the recruitment of both RelA and CCAAT/enhancer-binding protein beta to the IL-8 promoter. *J. Biol. Chem.* **284**:4191-4199.
292. **Vernet, T., E. Ziomek, A. Recktenwald, J. D. Schrag, M. C. de, D. C. Tessier, D. Y. Thomas, and M. Cygler.** 1993. Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **268**:26212-26219.
293. **Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg.** 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**:873-876.
294. **von Baum, H., S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, and C. Luck.** 2008. Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* **46**:1356-1364.
295. **Wagner, C., C. Kronert, P. C. Luck, E. Jacobs, N. P. Cianciotto, and J. H. Helbig.** 2007. Random mutagenesis of *Legionella pneumophila* reveals genes associated with lipopolysaccharide synthesis and recognition by typing monoclonal antibodies. *J. Appl. Microbiol.* **103**:1975-1982.
296. **Walev, I., U. Weller, S. Strauch, T. Foster, and S. Bhakdi.** 1996. Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **64**:2974-2979.
297. **Weinbaum, D. L., J. Bailey, R. R. Benner, A. W. Pasculle, and J. N. Dowling.** 1983. The contribution of human neutrophils and serum to host defense against *Legionella micdadei*. *J. Infect. Dis.* **148**:510-517.
298. **Weltzien, H. U.** 1979. Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* **559**:259-287.
299. **Wheeler, P. R., K. Bulmer, and C. Ratledge.** 1990. Enzymes for biosynthesis de novo and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? *J. Gen. Microbiol.* **136**:211-217.
300. **Wheeler, P. R. and C. Ratledge.** 1991. Phospholipase activity of *Mycobacterium leprae* harvested from experimentally infected armadillo tissue. *Infect. Immun.* **59**:2781-2789.
301. **Wheeler, P. R. and C. Ratledge.** 1992. Control and location of acyl-hydrolysing phospholipase activity in pathogenic mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **138**:825-830.

LITERATURVERZEICHNIS

302. **Winn, W. C., Jr. and R. L. Myerowitz.** 1981. The pathology of the *Legionella pneumonias*. A review of 74 cases and the literature. *Hum. Pathol.* **12**:401-422.
303. **Wiseman, G. M.** 1975. The hemolysins of *Staphylococcus aureus*. *Bacteriol. Rev.* **39**:317-344.
304. **Woo, A. H., A. Goetz, and V. L. Yu.** 1992. Transmission of *Legionella* by respiratory equipment and aerosol generating devices. *Chest* **102**:1586-1590.
305. **Wright, E. K., S. A. Goodart, J. D. Gowney, V. Hadinoto, M. G. Endrizzi, E. M. Long, K. Sadigh, A. L. Abney, I. Bernstein-Hanley, and W. F. Dietrich.** 2003. Naip5 affects host susceptibility to the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. *Curr. Biol.* **13**:27-36.
306. **Yamamoto, Y., T. W. Klein, C. A. Newton, R. Widen, and H. Friedman.** 1988. Growth of *Legionella pneumophila* in thioglycolate-elicited peritoneal macrophages from A/J mice. *Infect. Immun.* **56**:370-375.
307. **Yeung, T., B. Heit, J. F. Dubuisson, G. D. Fairn, B. Chiu, R. Inman, A. Kapus, M. Swanson, and S. Grinstein.** 2009. Contribution of phosphatidylserine to membrane surface charge and protein targeting during phagosome maturation. *J. Cell Biol.* **185**:917-928.
308. **Yu, V. L., J. F. Plouffe, M. C. Pastoris, J. E. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. M. Heath, D. L. Paterson, and A. Cheresky.** 2002. Distribution of *Legionella species* and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J. Infect. Dis.* **186**:127-128.
309. **Zhao, Y. and V. Natarajan.** 2009. Lysophosphatidic acid signaling in airway epithelium: role in airway inflammation and remodeling. *Cell Signal.* **21**:367-377.
310. **Zhao, Y., J. A. Stuckey, D. L. Lohse, and J. E. Dixon.** 1997. Expression, characterization, and crystallization of a member of the novel phospholipase D family of phosphodiesterases. *Protein Sci.* **6**:2655-2658.

8 Anhang

Volllängen-Sequenzvergleich von PlaB mit PlaB-Homologen

L.pneu	-----MIVIFVHGWSVTHNTNTYGELPQWLENQSKQKGLDI	35
L.spir	-----MIVIFLHGWSVTHNTNTYDALPLWLES LGDKGLDI	35
L.dran	MLLNNLISSISTMPCCS AKKLRSVMIVIFVHGWSVTHNTNTYGDLPKWLENQSKDETLDI	60
P.ing	-----MLVIFIHGWSVVDTSAYGLLPEALAEQADQYKLKI	35
D.acet	-----MRLIFVHGWSVTNTDTYQQLPEALQAASADYDLSL	35
S.peal	-----MELVFVHGWSVTHTDTYAQLPQALVKLLGD-ELNL	34
M.algi	-----MTIGLGGTMLIIHGWSD-GASSFKSLARKLTSPGPDRLYSS	41
P.aeru	-----MPR-----SIVIVHGWS-DKSKFRRLAEQLEA-----WFGS	31
P.mari	-----MKEITLILHGWS-DSESFKDVKAFLIKNGIG-----	31
	:::*** : : : *	
L.pneu	QVGNIIYLGRYISFDDTVTVDDIARAFDQAVRDE--IADKL RDGQRFACI THSTGGPIVRK	93
L.spir	QVGNIIYLGRYISFDDTVMVDDIARAFDHVRDD--IADKLQDGERFACI THSTGGPIVRK	93
L.dran	LVGNIIYLGHYISFDDTITVDDIARAFDQAVRDE--IADKL RDGARFACI THSTGGLVVRK	118
P.ing	EIKHIWLGRYISFNDEVSADVARAFHDAALHDQ--IPNGVGGIADFSCITHSTGGPVVRE	93
D.acet	DLHHIYLGRYVSFHDEVTLDDIARGLHQALHD--LPDNADQIQPFSCITHSTGGPVVRY	92
S.peal	TIRHIHLGRYISFDDAVRLSDIAKFNDHAHLEL--LGK----KPFVITHSTGAAVIRH	87
M.algi	EIRHLRLADYISLDDEIGYDDLVEAMQRAWIKE--ELPTAP--RSVDVITHSTGGLVVRH	97
P.aeru	APTQIRLADWVSLQDDVTYADLATALDRAWTAS--GLSRAP--RSVDVVVHSAGALVLRD	87
P.mari	SVDTIYYADYESREDNVTYEDVIDGLYDRFREKGFIDKEGNKLVLDLNVIVHSTGGLVIRH	91
	: . : * . * : * : . : . : * * . : *	
L.pneu	WMDLYFKNN-LAKCPLSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKS-FFE---GIEPGKCVL	148
L.spir	WMDLYFGNN-LAKCPLSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKS-FFE---GVEPGEHVL	148
L.dran	WMDLYFKNN-LEKCP LSHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLGRIKS-FFE---GVEPGQHV L	173
P.ing	WLNRFYMGSLLSQSPLRHLVMLAPANHGSSALALGKQVRGRIKA-WFS---GVEPGQRIL	149
D.acet	WLNRFYGPKEKLSATPLCHLVMLAPANHGSSALAILGKQVRGRIDA-WFK---GVEPGQVR L	148
S.peal	WLQFFFTGDKLSRCP LTHLIMLAPANHGSSALAQLGKSRLVGRIS-FFA---GVEPGQGIL	143
M.algi	WLTFYFKPR---TSPIKRLMLAPANFGSPLAHTGRSLIGRAVK-GWKGTRLFETGTKIL	153
P.aeru	WLTRRFTPA---SAPVKRLMLAPANFGSPLAHKGRSFIGRVLK-GWN-RFVGQTGTQVL	142
P.mari	FIAEYYRHR-IDKCPVKKIIMLAPANFGSPLAHYKSLGVMVFKGRYKFGDMFEVGRRL	150
	: : * : : * * * . * . * : * : *	
L.pneu	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGVYSFVLTGQKIDRQFYDAVNSYTGESGSDGVVRV	208
L.spir	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCPANGIYTFVLTGQKIDRQLYDAVNSYTGESGSDGVVRV	208
L.dran	DWLELGSDMSWQLNESWLDYDCTANGIYFVLTGQKIDRQLYDAVNSYTGESGSDGVVRV	233
P.ing	DWLSLGSHQQIALAQSYLTYPKPAENKFFPFVLTGQTIDKKLYDFVNNYLVEAGSDGVVRV	209
D.acet	DWLCGSRQRRLLNESGLHYDYAHHNIYFVLTGQGIDRKFYDFINNYLTFEPGSDGVVRV	208
S.peal	DWLELGSDGQYDLNRYWLDN-FSLDGPLPFVLTGEAIDSQFYDYLSYTAEGSDGVVRV	202
M.algi	KGLEIASPYSWSLAEKDIFAEQEYYPGRILCT-VLVGNIGYNGISALANKPGTDGTVRV	212
P.aeru	KGLELGSPYSWTLAERDLFAAESWYGAGRLAT-VLVGNVGYNGVEAIAEAGDGTVRI	201
P.mari	NGLELASPYQWKLAHMDLLKERPYN-RNQIQTFIFVGNKGYGGLRKLNVNKKGTDGTVVV	209
	. * : . * . : : * : . * : : * * . *	
L.pneu	AATNMNYSLLKLHQEGDNGES-----LVVAKMTRTQPMAGVLPGLSHSGKNIGII	259
L.spir	AAANMNYSLLKLHQEGTNGDS-----LVVAKMKRAQPTAFGVLPGLSHSGKNIGII	259
L.dran	AATNMNYSLLKLHQEGNNGDN-----LVVAKMIRTQPMAGVLPGRSHSGKNIGII	284
P.ing	ACANLNYSMIKLVEEKVAHDSDEKKARLLEVEGELQRPS-LAPFGVIPGASHSGKDKGIM	268
D.acet	AGANMNRYRFFSVCSQSDDEVLRKSPYTRLAYDKKHPVRTSPAVPLGVYNQYSHSGKDMGIM	268
S.peal	ASANLNFSYLLLAETAHTCDGFDKRCISTLKLSKHSQPHQQTAFEVIKNASHSGSKGIM	262
M.algi	STANLNATKLDLDFTLAQES-----VAITGRRDHGSTAFGIADQEDHS-----	255
P.aeru	STANLNARRLTLELDVRQRRAR-----PGWSLRSRGEIAFAILDGENHS-----	245
P.mari	CGTNLNPVKFILDFSREGKAV-----DVYVKDYRFDTAFVLRNYDHC-----S	253
	. : * : : : : . *	
L.pneu	RSITMANAATHPTAIWILRCLQVKSRDSYNKLVKELDNITKETQKNEHKEFVKTLVFTRE	319
L.spir	RSVTMANAATHPTAIWVLRCLQVKNRDAYNTLAKELDKITKETQKNEHTESVKTLIYKRE	319
L.dran	RSVTMANAATHPTTIWVLRCLQVKNRDNTLAKELDKITKETQKNEHTAVKTLIYKRE	344
P.ing	RSVLSAKSKNKPQVTEILKCLTVNNQADYTNRGKELEILTQESQ-----	312
D.acet	RSIKQDKGAAQPVVADILKCLQIESADGYQRAEELNALTETMQTE-----ACQQ	318
S.peal	GSVTNRNAKNKPVVQRIAQCLRVTSFKQYRQLSDEMSQASSIKR-----	306
M.algi	SIAAKDGGPHRRSIWKLIREALKVEDSDFSKWQDTLTKHNQEVTKAE-----RRRG	307
P.aeru	TLALKDRGPKNPLSLELIRAALEVEDADYKTSAGSFP--WQRRIDQFD-----PGIA	295
P.mari	IVDDIKPGRKSQIADLVLRRAIKIKPEEYAEFKKELEEITEKTFKN-----	299
	. : : . : : .	

ANHANG

L.pneu	YITNRYSMIIFRLIDDRGNHLI--DYDLYLTAGPQYSEQ-----A	357
L.spir	YITNRYSMIIFRLIDDRGNHLV--DYDLYLTAGPEYSEQ-----A	357
L.dran	YSTNRYSMIIFRLIDDRGNHLV--DYDLYLTAGPKYSEE-----A	382
P.ing	KGTHRYVMLVFIKDDQGDVPN--DYDLLLLGGDSHNP-----K	350
D.acet	RDCCRYAMLVFRIKDDQGNTFSKDDYDILLGGKSYQPN-----I	358
S.peal	--KPRACMLVVRVTDGTGLPVE--DFDILLSSGPHFVPG-----E	342
M.algi	THHDSYQNTVIRVIDNQSSVQ--DYVIEFFVNDSSGRRNRHR-----TRL	351
P.aeru	ERSPRYLNLVSHVCDDLQGEVH--DYFIQFFRKLNSDRRFEQR-----	336
P.mari	--REIYQQFIVRAVDDHNKPIK--DYTIEFFVYKNGRYIRNGEFTKKKISAEEEYWSRR	355
	: * : . . * : : :	
L.pneu	LPAGFFVDRQRNLNNRGKLTFFLDYDIME--GGINTPKMQGN-LGFRVKAYPESSDQALAY	415
L.spir	LPAGFFVDRQRNLNNRGKLTFFLDYDIME--AGINTPKMQGN-LGFRIKAYPQSSGQALAY	415
L.dran	LPGKFFVDRQRNMHNRGKLTFFLDYDIME--AGINTPKMQGN-LGFRIKAYPEASNQALAY	440
P.ing	LTKGFFVDRQQNAHPNHLIYYVDYDLV-----IKNKL-TGFRVIARPAD---GFVF	398
D.acet	MPKSFLRDRQMNGKTSN-LVFYIDVDQFH-Q-----IKDSQ-FGIRVIARPQK---GFSY	407
S.peal	FKKGFMLDKQKNHTNKHVLTFFYFDADKLA-K-----VSE GK-IGIRVEPRENS---GMCY	392
M.algi	LQENVVANVHAWCDDASYSRSLVNCTELS-KILD-KESDDLNISITASP--DIMNRPVGY	407
P.aeru	FYERVIADVHPYEDNPAYRSIHLSVQALD-ELLAGFAVDSLSSLVSAQPLFDPQPVG	395
P.mari	FHELITDEFHNNSTDPFRFRFIVGIKKLKNEIKECKSLGSDIVLSMKIYVPRVDEGIYY	415
	: . : : :	
L.pneu	YRLDFHSSLADIH-----KILHPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISSNNLTP-----	461
L.spir	YRLDFHSSLADIN-----KILHPNETVMIEIMLQRRVDRTVSRITNNLTP-----	461
L.dran	YRLDFHSSLADIN-----KILQPNETVMVEIMLQRRVDRTVFRISSNNLSP-----	486
P.ing	YHVVEYRANGLNIN-----DLIKPNETFYVEIQLHRCVDKNVFRMDNASDPKLKE	449
D.acet	YQWAEFRSDGVSLT-----DIVAPNQTTYVDITLKRCDVKNVFRFARGD-----	451
S.peal	YLSAEFRSDVEQVH-----ELLIADQTTMVDIVLQRRIKPETFSFIAPK-----	436
M.algi	RTYTDDEDISTLCLDQNALR----DLFKPNRTLLITMKIKRYQKDNVQFKSIN-----	456
P.aeru	SAVGPGDSEGLGVPRERLG----EFFAAHQTLRLRLRLVDGRVFLKDA-----	443
P.mari	ETEKLKNIILLRTENGQIVDEKPSLFYPNTTLLIEMKINRSTKYVTVDIKPRKH-----	469
	:. . . * : : : * . . :	
L.pneu	-----AKISGKPTGKKID--	474
L.spir	-----AKISVKPTGKTVD--	474
L.dran	-----EKISAKPTGKKVD--	499
P.ing	GFLIKSETRHSFENLEPSKEEINKS	474
D.acet	-----EKRGSEFKGVKADGGEIKDL	470
S.peal	-----DGGDFSYLIDE-----	447
M.algi	-----	
P.aeru	-----	
P.mari	-----	

Die Motive der für *L. pneumophila* PlaB essentiellen Aminosäuren der katalytischen Triade sind grau unterlegt. Abkürzungen: *Legionella pneumophila* (L.pneu), *Legionella spiritensis* (L.spir), *Legionella drancourtii* LLAP12 (L.dran), *Psychromonas ingrahamii* (P.ing), *Desulfuromonas acetoxidans* (D.acet), *Shewanella pealeana* (S.peal), *Marinobacter algicola* (M.algi), *Pseudomonas aeruginosa* PA7 (P.aeru) and *Persephonella marina* (P.mari). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW2 erstellt (s. Tabelle 3.19).